CHARAKTERISIERUNG VON ANTHOCYANEN UND DEN ENZYMEN PHENYLALANIN-AMMONIUM-LYASE UND CHALKONSYNTHASE IN VERSCHIEDENEN ENTWICKLUNGSSTADIEN DEFINIERTER GENOTYPEN VON MATTHIOLA INCANA R. Br.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von
SUSANNE RALL
aus
Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Charakterisierung von Anthocyanen und den Enzymen Phenylalanin-Ammonium-Lyase und Chalkonsynthase in verschiedenen Entwicklungsstadien definierter Genotypen von Matthiola incana R.Br.

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von

Susanne Rall
aus
Stuttgart

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	08. September 1983
Dekan:	Professor Dr. K.-P. Hadeler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Hemleben
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H.-U. Seitz

Frau Prof. Dr. Vera Hemleben danke ich herzlich für ihre intensive wissenschaftliche Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ausserdem Herrn Prof. Dr. K. Hahlbrock (Köln), der freundlicherweise das CHS-Antiserum zur Verfügung stellte.
Für eine Einweisung in die PAP-Methode danke ich Herrn Dr. R. Stick (Max-Planck-Institut für Virusforschung).

Herzlich danken möchte ich Frau U. Bessler für die zuverlässige Betreuung von Zellkulturen und Frau C. Rehm für das Fertigstellen der Arbeit.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und des 8. Stocks danke ich für das angenehme Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Frau A. Eble, Frau M. Frey und Frau Dr. B. Leweke für vielfältige Hilfe im Labor und für eine Zeit der Freundschaft.

UNIV. LEIDEN BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Genexpression als Teil der Zelldifferenzierung	1
1.2	Flavonoide als Beispiel sekundärer Pflanzenstoffe	7
1.3	Matthiola incana	16
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Pflanzenmaterial	19
2.1.1	Matthiola-Genetik	19
2.1.2	Matthiola-Blütenstadien	22
2.1.3	Anzucht von Keimlingen	22
2.1.4	Anzucht von Kalluskulturen	23
2.2	Absorptionsspektren von Keimlingen, Petalen und Kalluszellen	23
2.3	PAL-Induktion durch Licht in Keimlingen und Kalluskulturen	24
2.3.1	Induktion	24
2.3.2	Aufarbeitung der Keimlinge	25
2.3.3	Aufarbeitung der Kalluszellen	26
2.3.4	Bestimmung der PAL-Aktivität	26
2.4	CHS-Enzymaktivität in Blüten	26
2.4.1	Blüten-Aufarbeitung	26
2.4.2	Bestimmung der CHS-Aktivität	27
2.4.3	Indirekter Nachweis aktiver CHS durch Immunpräzipitation	27
2.5	Nachweis von CHS-Enzymprotein durch Protein-Blotting, Immunpräzipitation und PAP-Färbung	28
2.5.1	Protein-Auftrennung durch SDS-PAGE	28
2.5.1.1	Blüten-Aufarbeitung	28
2.5.1.2	Aufarbeitung von Kalluszellen	29
2.5.1.3	Denaturierung der Proteine	31
2.5.1.4	SDS-Disk-Elektrophorese	31

		Seite
2.5.2	Protein-Blotting	32
2.5.3	PAP-Methode	33
2.6	Proteinbestimmungen	35
2.7	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	36
2.7.1	Kulturmedien für Kalluskulturen	36
2.7.2	Puffer und Lösungen	39
2.8	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	41
2.8.1	Chemikalien	41
2.8.2	Verbrauchsmaterial	42
2.9	Abkürzungen	42
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Charakterisierung der Versuchssysteme	44
3.2	Nachweis der Anthocyansynthese in Keimlingen, Blüten und Kalluszellen	47
3.2.1	Keimlinge	47
3.2.2	Blüten	48
3.2.3	Kalluskulturen	49
3.3	Die PAL in Matthiola incana	57
3.3.1	Nachweis von PAL-Enzymaktivität	57
3.3.2	Induktion von PAL-Enzymaktivität durch Licht	58
3.3.2.1	Keimlinge	59
3.3.2.2	Kalluskulturen	63
3.3.3	Nachweis von PAL-Enzymprotein	65
3.4	Die CHS in Matthiola incana	70
3.4.1	Vorversuche zur Bestimmung der CHS-Enzymaktivität in Petalen	71
3.4.1.1	Abhängigkeit von der Protein-Konzentration	72
3.4.1.2	Quench durch BSA	72
3.4.1.3	CHS-Enzymaktivität in Petalen	75
3.4.2	Immunpräzipitation der CHS	76
3.4.2.1	Linie 07	77
3.4.2.2	Linie 18	78

		Seite
3.4.3	Nachweis von CHS-Enzymprotein mit der PAP-Methode	84
3.4.3.1	Aufarbeitung von Petalen für die SDS-PAGE	84
3.4.3.2	Aufarbeitung von Kallusgewebe für die SDS-PAGE	85
3.4.3.3	Auftrennung von Petalen-Proteinen auf SDS-PA-Gelen	85
3.4.3.4	Auftrennung von Kallus-Proteinen auf SDS-PA-Gelen	86
3.4.3.5	Protein-Blotting	86
3.4.3.6	Spezifität des Nachweises	88
3.4.4	CHS-Enzymprotein in genetisch definierten Linien	90
3.4.4.1	Petalen	90
3.4.4.2	Kalluskulturen	93
3.4.5	Molekulare Charakterisierung der CHS	93
3.4.5.1	Petalen	93
3.4.5.2	Kalluskulturen	97
3.4.6	Expression der CHS während der Blütenentwicklung	99
4	DISKUSSION	102
4.1	Die Synthese von Anthocyanen in Matthiola incana	103
4.2	Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase - Induktion durch Licht und molekulare Charakterisierung -	106
4.3	Die Chalkonsynthase	116
4.4	Die Expression der CHS in genetisch definierten Matthiola-Linien	119
4.5	Die Expression der CHS während der Blütenentwicklung	125

		Seite
5	ZUSAMMENFASSUNG	130
6	LITERATUR	134

1 EINLEITUNG

1.1 Genexpression als Teil der Zelldifferenzierung

Biologische Vorgänge, die mit dem Begriff "Genexpression" bezeichnet werden, müssen in den grossen Zusammenhang der Differenzierung gestellt werden. "Differenzierung" ist ein Grundphänomen des Lebens, und ihre Erforschung stellt eine der grossen Aufgaben der Biologie dar. Differenzierungsvorgänge führen zu Ergebnissen, die von ausserordentlicher Vielfalt sind. Dies wird offensichtlich in der strukturellen und funktionellen Verschiedenheit von Zellen, Geweben und Organen vielzelliger Lebewesen. Betrachtet man jedoch die molekularen Mechanismen der Differenzierung, so werden in zunehmendem Masse Ähnlichkeiten zwischen den beteiligten Vorgängen deutlich: Unter dem genphysiologischen Aspekt betrachtet, mündet die Differenzierung in die Verwirklichung bestimmter Teile einer vorgegebenen genetischen Information. Sie ist damit eng verknüpft mit dem Vorgang der differentiellen Genaktivität. Wird vorausgesetzt, dass alle Zellen eines Organismus über dieselbe genetische Gesamtinformation verfügen, so legt diese die "Reaktionsnorm" fest, innerhalb deren Grenzen sich eine Zelle differenzieren kann. Andererseits können auch selektive Genom-Umordnungen wesentlich zu Differenzierungsprozessen beitragen. Auf diese Z e l l differenzierung wiederum sind jene übergeordneten Differenzierungsvorgänge zurückzuführen, die schliesslich zur Entstehung der unterschiedlichsten Gewebe und Organe führen.

Die Zelldifferenzierung kann folgende Schritte umfassen:

- den Empfang eines extrazellulären Signals und seine Umwandlung in zelleigene Signale,
- die Abrufung von Teilinformationen des genetischen Materials (differentielle Genexpression),

- die Organisation von Genexpressions-Programmen und
- die Koordination der Differenzierung einzelner Zellen im Rahmen übergeordneter Entwicklungsprogramme (nach Nover et al., 1982a).

Ein bestimmter Differenzierungszustand wird somit durch eine Vielzahl von Schritten erreicht oder aufrechterhalten. Dazu müssen alle Teile eines Differenzierungsvorganges in ihrem räumlichen und zeitlichen Ablauf und in ihrem quantitativen und qualitativen Ausmass einer umfassenden, koordinierten Regulation unterliegen. Dem Teilaspekt Genexpression kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu.

Signalketten bei der Zelldifferenzierung

Differenzierungsvorgänge stellen oft die Antwort von Zellen auf ein extrazelluläres Signal dar. Dieses Signal wirkt jedoch meist nicht direkt auf entscheidende Zellreaktionen ein, sondern es stellt das Anfangsglied einer ganzen Signalkette dar. Solche Signalketten stellen schliesslich die Verbindung her zu Zellfaktoren, die an der Expression von Genen beteiligt sind. Abgesehen von relativ einfachen Signalsystemen bei Mikroorganismen sind solche Signalketten von komplizierter Struktur.

Beispiele für "einfache" Signalketten findet man bei Bakterien, wo die Signale Arabinose (Lee et al., 1981), Lactose (Dickson et al., 1975) oder Tryptophan (Crawford und Stauffer, 1980) direkt die Synthese von Proteinen beeinflussen, die an ihrem Stoffwechsel beteiligt sind. Bei Säugern sind vereinzelt ähnliche Beispiele bekannt (Gross, 1980).

Ausserordentlich komplexe, hormonelle und hormonartige Signalsysteme findet man in höheren Pflanzen und Tieren vor. Dabei ist die Signalkette oftmals nicht in ihrem vollen Umfang bekannt. Wichtige Beispiele für Signale stellen Steroid-Hormone (Swaneck et al., 1979; Evans et al., 1981), Insulin (Zühlke, 1982), Antigene (Nover et al., 1982b) oder Interferon (Baglioni, 1979) dar. Bei Pflanzen sind neben Licht (Mohr, 1980) Faktoren wie Tageslänge, Temperatur, Schwerkraft oder Pflanzenhormone zu nennen. Grundsätzlich hängt die durch ein Signal hervorgerufene Antwort dabei von der Art der "Ziel"-Zelle ab.

Differentielle Genexpression

Die Expression von Genen stellt den zentralen Punkt der Zelldifferenzierung dar. Das Ergebnis dieser Expression sind RNS-Moleküle und biologisch aktive Proteine. Möglichkeiten für Regulationsvorgänge ergeben sich bei der Synthese, dem Processing und dem Abbau der mRNS und der von ihr codierten Proteine (im Fall von Proteinen als Endprodukt).
Regulierende Eingriffe sind bei den folgenden Vorgängen möglich:

- Aktivierung von Genen und Transkription

Die genauen Vorstellungen über die molekularen Mechanismen in prokaryotischen Systemen basieren auf dem Modell von Jacob und Monod (1961) für das lac-Operon von E. coli. Für Eukaryonten werden im wesentlichen ähnliche Vorgänge postuliert, wenngleich die gesicherten Ergebnisse hier sehr viel spärlicher sind. Die Ursache dafür liegt darin, dass oftmals keine geeigneten Mutanten zur Verfügung stehen. Eine andere entscheidende Schwierigkeit stellt die höhere Komplexität der eukaryotischen Zelle dar.

In diesem Zusammenhang ist die Kompartimentierung der Zelle von Bedeutung, ferner u.a. die Methylierung der DNS (Razin und Riggs, 1980; Felsenfeld und McGhee, 1982) und die Struktur des Chromatins (Stein und Kleinsmith, 1975, Mathis et al., 1980; Weisbrod, 1982).

- Processing von prä-mRNS, Abbau von mRNS und Translation

Regulationsschritte werden vor allem durch Informationen gesteuert, die in der Primär- und Sekundärstruktur der RNS-Moleküle enthalten sind. Das Processing von prä-mRNS tritt hauptsächlich bei Eukaryonten auf. Das Vorkommen lang- und kurzlebiger mRNS ist dagegen sowohl für pro- als auch für eukaryotische Zellen gut belegt.
Teilaspekte der komplexen Translations-Regulation bei Eukaryonten konnten geklärt werden, daran hatten moderne Techniken wie die Sequenzierung von Nukleinsäuren und die Klonierung definierter DNS-Stücke entscheidenden Anteil (Lodish, 1976; Revel und Groner, 1978; Prescott und Goldstein, 1980; Austin und Kay, 1982).

- Post-translationelle Modifikation von Proteinen

Die Fähigkeit von Proteinen, ihre katalytischen, strukturellen und regulatorischen Aufgaben zu erfüllen, hängt in entscheidendem Mass von post-translationellen Proteinmodifikationen ab (Übersicht für pflanzliche Proteine in Beevers, 1982). Die Histonproteine zeigen beispielhaft die Bedeutung solcher Modifikationen (Isenberg, 1979). Ausserdem muss in immer mehr Fällen die begrenzte Proteolyse von Precursor-Proteinen angenommen werden (Steiner et al., 1980). Dieses proteinogene Processing stellt vermutlich einen wichtigen Mechanismus dar, Proteine in die richtigen Zellkompartimente gelangen zu lassen (Signal-Hypothese, Blobel und Dobberstein, 1975).

- Inaktivierung und Abbau von Proteinen

Jede Zelle verfügt über die genetische Information zur Synthese einer Vielzahl verschiedener Proteine. Je nach ihrem Stoffwechsel- oder Entwicklungszustand wird davon eine in quantitativer und qualitativer Hinsicht definierte Auswahl synthetisiert. Ändert sich der Zustand der Zelle, so muss die "alte" Proteinauswahl zugunsten einer "neuen" abgeändert werden. Solche Umordnungen des Proteinmusters können drastischer Art sein, wie Vorgänge bei der Samenreifung und -keimung von Pflanzen (Larkins, 1981; Müntz, 1982; Bewley, 1982) oder die Reifung von Erythrozyten zeigen. Ohne Zweifel enthält dabei das Proteinmolekül selbst eine Art von Information über die Art und die Geschwindigkeit seines Abbaus. Dieser Abbau kann sehr unterschiedlich schnell ablaufen, wie die Halbwertszeiten von Proteinen zeigen (Matile, 1982). Der proteolytische Abbau geht wiederum selektiv vonstatten durch eine Kombination von Proteasen mit zellspezifischen Inhibitoren (Ryan and Walker-Simmons, 1981; Ryan, 1981). Er wird entscheidend beeinflusst durch die Konformation, die Modifikation und die Kompartimentierung der Proteine. Enzyme unterliegen ferner dem Einfluss ihrer Produkte, Substrate, allosterischen Effektoren (Koshland, 1970), sowie den Ionen- und pH-Verhältnissen (Roach, 1980).

Genexpressions-Programme

Die Genexpression innerhalb einer einzelnen Zelle unterliegt in einem vielzelligen Organismus der Kontrolle übergeordneter Programme. Obwohl über den Vorgang der Genexpression viele Details bekannt sind, ist das Wissen über die Organisation von Genexpressions-Programmen in höheren Eukaryonten sehr unvollständig (Übersichtsartikel bei Lewin, 1974; O'Malley, 1977; Ochoa und Haro, 1979; Prescott und Goldstein, 1980; Pérez-Bercoff, 1982).

Einfache Genexpressions-Programme in Form einer sukzessiven Enzyminduktion treten ausser in Mikroorganismen (lac-System von E. coli) auch in höheren Pflanzen (s.u.) und Tieren auf. Beispiele für weitaus kompliziertere Programme sind die Bildung von Endosporen bei Bakterien (Szulmajster, 1979) und die Entwicklung von Erythrozyten in Säugern (Russell, 1979).

Festzustellen bleibt jedoch, dass in vielen Fällen die Integration der Zelldifferenzierung in die Entwicklung eines vielzelligen Systems auf molekularer Ebene nicht geklärt ist.

Genexpression in Pflanzen

In vielen Fällen liegen, verglichen mit prokaryotischen oder tierischen Systemen, für Pflanzen weitaus weniger molekularbiologische Ergebnisse vor. Allerdings wurden auch hier in den letzten Jahren Fortschritte erzielt was die Genomorganisation (Leaver, 1980; Wenzel und Hemleben, 1982a) und die Synthese von Proteinen betrifft (Bogorad, 1977; Weeks, 1981). Bevorzugt wurden "überschaubare" oder experimentell leichter zugängliche Teile der pflanzlichen DNS wie Mitochondrien-DNS (Quetier und Vedel, 1980; Leaver und Forde, 1980), Chloroplasten-DNS (Bogorad et al., 1980), Satelliten-DNS (Ingle et al., 1975; Hemleben et al., 1982a) oder ribosomale DNS (Friedrich et al., 1979; Dyer und Bedbrook, 1980) untersucht. Es liegen Daten vor für die Gen-Sequenz der grossen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase in Mais (McIntosh et al., 1980), für das Phaseolin-Gen der Bohne (Sun et al., 1981), für das Actin-Gen von Soja (Shah et al., 1982) und von Mais (Shah et al., 1983).

In Einzelfällen konnte man den Zusammenhang zwischen einer Mutation und Effekten auf die Transkription erkennen (Zein-Gen in Mais, Langridge et al., 1982). Von den pflanzlichen Proteinen sind vor allem die häufig und in grosser Menge auftretenden gut charakterisiert (Ramshaw, 1982; Miège, 1982), wie die Beispiele der Chloroplasten-Proteine (Ellis et al., 1980; Steinback, 1981) und der Samen-Speicherproteine zeigen (Larkins, 1981).
Die Beziehung zwischen einer spezifischen mRNS und ihrem Proteinprodukt konnte für eine Reihe von Systemen hergestellt werden, so für die grosse (Hartley et al., 1975) und die kleine (Dobberstein, 1977) Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase, die α-Amylase der Gerste (Akazawa und Miyata, 1982; Ho, 1980), die Phenylalanin-Ammonium-Lyase und die Chalkonsynthase der Petersilie (Schröder et al., 1979).

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag leisten zu Fragen der Genexpression in einer höheren Pflanze. Sie hat die Expression von Enzymen der Levkoje (Matthiola incana, Brassicaceae) zum Gegenstand, die an der Synthese von Flavonoiden beteiligt sind.

1.2 Flavonoide als Beispiel sekundärer Pflanzenstoffe

Der Primärstoffwechsel versorgt alle Zellen eines Organismus mit einer Grundausstattung lebensnotwendiger Bestandteile. Darüberhinaus sind Mikroorganismen, Pflanzen und Tiere in der Lage, Sekundärprodukte zu synthetisieren. Diese werden nur in bestimmten Zellen, Geweben und Organen bzw. in bestimmten Entwicklungsphasen gebildet. Die Ausprägung des Sekundärstoffwechsels stellt einen Teilaspekt der Zelldifferenzierung dar.

Zur Biosynthese, zu Veränderungen und zum Abbau von Sekundärprodukten werden spezielle Proteine (oft Enzyme) benötigt. Die Spezialisierung einer Zelle, die als Folge von Differenzierungsvorgängen eintritt, wird somit nicht nur durch spezifische Sekundärprodukte, sondern auch im Auftreten der in diesem Zusammenhang notwendigen Enzyme deutlich.

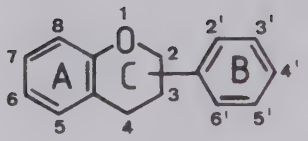
Die physiologische und ökologische Bedeutung der Produkte des Sekundärstoffwechsels kann für den ganzen Organismus ausserordentlich wichtig sein. Dies kann gezeigt werden am Beispiel der pflanzlichen Lignine, Flavonoide, Alkaloide, Terpenoide und Phytoalexine (Conn, 1981).

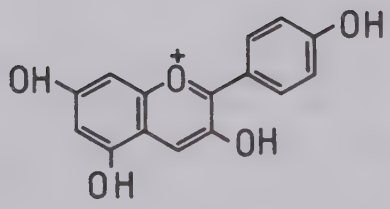
Die Flavonoide stellen typische Inhaltsstoffe höherer Pflanzen dar (Harborne et al., 1975; Hahlbrock, 1981). Sie bilden neben den Carotinoiden die wichtigsten Blütenfarbstoffe, sind jedoch nicht nur auf Blüten beschränkt. Ihre Bedeutung liegt in der Anlockung von bestäubenden Tieren sowie im Schutz gegen UV-Licht und gegen Infektionen durch phytophatogene Organismen.
Flavonoide können in allen Teilen einer höheren Pflanze auftreten; ihre Menge und Zusammensetzung schwankt jedoch nicht nur zwischen einzelnen Arten erheblich, sondern auch während verschiedener Entwicklungsstadien und zwischen einzelnen Organen einer Pflanze. Dies macht deutlich, dass die Flavonoidbiosynthese und die Synthese anderer Sekundärprodukte integriert sind in die Zelldifferenzierung, die Gewebedifferenzierung und in übergeordnete Entwicklungsprogramme.

Zur Biosynthese der Flavonoide

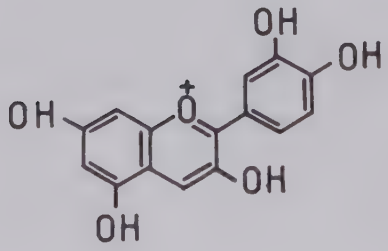
Die Flavonoide gehören zu den am besten untersuchten pflanzlichen Sekundärstoffwechselprodukten (z.B. Seyffert, 1960; Hess, 1964, 1965; Forkmann, 1980; Seyffert, 1982; Gerats et al., 1982). Wesentlichen Anteil an der Aufklärung der Biochemie und Regulation ihrer Synthese hatten die Arbeitsgruppen um Grisebach und Hahlbrock mit Untersuchungen an Petersilie-Zellsuspensionskulturen (Hahlbrock und Grisebach, 1979; Grisebach, 1980; Hahlbrock, 1981).

Die einzelnen Flavonoidklassen (z.B. Flavanone, Flavone, Flavonole, Anthocyanidine) unterscheiden sich durch den Oxidationszustand des Heterozyklus C. Die Verbindungen, die einer bestimmten Flavonoidklasse zugerechnet werden, weisen unterschiedliche Hydroxylierungs- und Methylierungsmuster des B- und auch des A-Rings auf, ferner verschiedene Modifizierungen durch Glykosidierung und Acylierung. Als Beispiele zeigt Abb. 1 das Hydroxylierungsmuster des B-Rings der Anthocyanidine Pelargonidin und Cyanidin.





Pelargonidin



Cyanidin

Abb. 1: Das Flavonoid-Grundgerüst mit Ring A, Ring B und dem Heterozyklus C (aus Hahlbrock, 1981). Ring B steht bei der Mehrzahl der Flavonoide in 2-Stellung.
Als Beispiel für zwei in dieser Arbeit wichtige Flavonoidverbindungen sind ferner die Anthocyanidine Pelargonidin und Cyanidin abgebildet.

Der Ring B und die C-Atome 2, 3 und 4 des Heterozyklus werden über den allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel der Pflanze angeliefert: Aus dem Shikimatweg abgeleitetes L-Phenylalanin wird durch die Enzyme der Gruppe I (Hahlbrock et al., 1976) zu p-Cumaroyl-CoA umgebaut (Abb. 2). Die Enzyme der Gruppe I sind die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5), die Zimtsäure-4-Hydroxylase (CAH, EC 1.14.13.11) und die p-Hydroxy-Zimtsäure-CoA-Ligase (CoA-Ligase, EC 6.2.1.12).

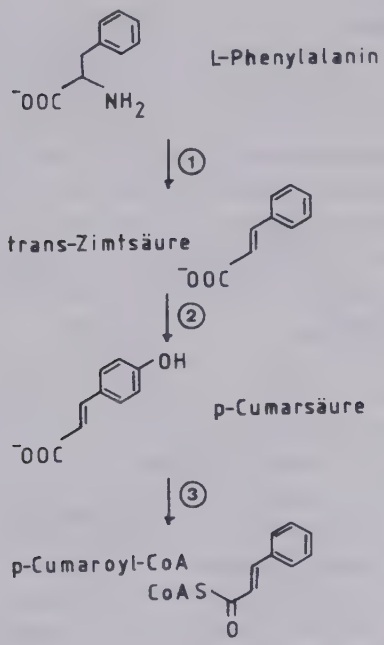


Abb. 2: Der allgemeine Phenylpropanstoffwechsel (schematisch) mit den daran beteiligten Enzymen (Gruppe I-Enzyme): ① PAL, ② CAH und ③ CoA-Ligase.

Die PAL stellt das Eingangsenzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels dar. Über substituierte Zimtsäuren bzw. deren CoA-Ester können daran anschliessend Flavonoide, aber auch Lignine, Chlorogensäure, Cumarine, Benzoederivate oder Phytoalexine synthetisiert werden. Die zentrale Bedeutung der PAL liegt in ihrer Lokalisation an einem Berührungspunkt zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel: Das Phenylalanin aus dem Shikimatweg wird hier entweder der Proteinsynthese oder - durch die PAL - der Phenylpropansynthese "zugeteilt".

Die PAL gehört zu den am besten untersuchten pflanzlichen Enzymen. Sie wurde von Koukol und Conn (1961) entdeckt und seither aus vielen Pflanzen isoliert und charakterisiert. Dies wird dadurch begünstigt, dass das Enzym relativ leicht zu isolieren, zu reinigen und auf seine enzymatische Aktivität zu testen ist (Hanson und Havir, 1981). Der Einsatz des spezifischen PAL-Inhibitors L-AOPP (L-α-aminooxy-β-phenylpropionsäure; Amrhein et al., 1976) ermöglichte zudem in vielen Systemen Einblicke in die Regulation der PAL (z.B. Amrhein und Gerhardt, 1979; Noë und Seitz, 1982).

Die Aktivität der PAL kann durch verschiedene Faktoren stimuliert werden, wie z.B. durch Licht, Verwundung, Äthylen, Pilz-Infektionen, verändertes Medium oder Verdünnung (bei Zellsuspensionskulturen). Dies wurde bei Untersuchungen der PAL in Keimlingen, Blättern, Knollen und Zellsuspensionskulturen vieler Pflanzen gefunden. Über die molekularen Ursachen dieser Stimulation gibt es jedoch keine einheitlichen Vorstellungen. Die untersuchten Systeme decken mehr oder weniger zwingend alle Möglichkeiten ab zwischen der verstärkten Transkription des PAL-Gens, einer Steuerung der PAL-Aktivität und einem verlangsamten Abbau des Enzyms (Hanson und Havir, 1981).

Die Schlüsselreaktion der eigentlichen Flavonoidbiosynthese, die Bildung des C_{15}-Grundgerüsts, stellt die schrittweise Kondensation von p-Cumaroyl-CoA mit 3 Molekülen Malonyl-CoA dar (Grisebach und Barz, 1969; Kreuzaler und Hahlbrock, 1975a und b; Hrazdina et al., 1976) (Abb. 3).

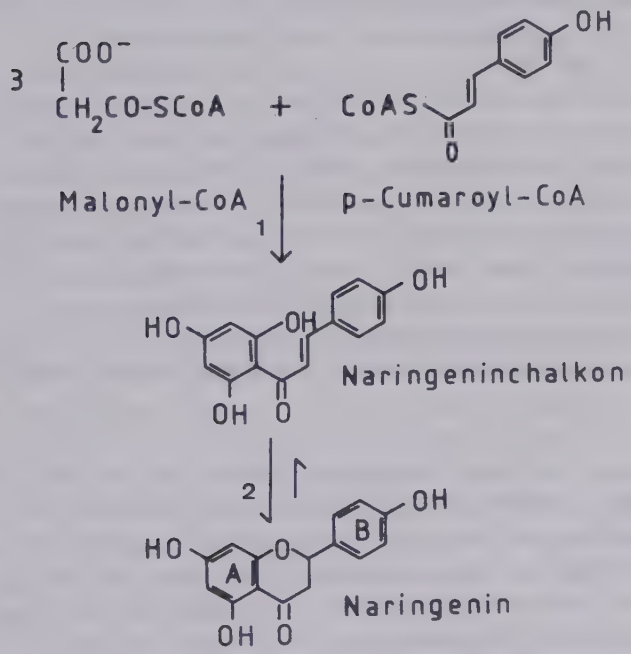


Abb. 3: Die Schlüsselreaktion der Flavonoidbiosynthese, die Entstehung des C_{15}-Grundgerüsts, wird durch die Chalkonsynthase (CHS; 1) katalysiert. Das entstehende Chalkon wird durch spontane Isomerisierung und durch die Chalkon-Isomerase (EC 5.5.1.6; 2) zum entsprechenden Flavanon umgesetzt.

Kreuzaler und Hahlbrock (1972) gelang mit lichtinduzierten Petersilie-Zellsuspensionskulturen erstmals der Nachweis des für diese Reaktion verantwortlichen Enzyms. Es wurde im folgenden extensiv bezüglich seiner Eigenschaften und Regulation charakterisiert (Kreuzaler et al., 1979; Hahlbrock, 1981). Entgegen früherer experimenteller Daten, ist das erste Produkt der Kondensationsreaktion ein Chalkon (Wiermann, 1972; Kuhn et al., 1978; Forkmann und Kuhn, 1979; Forkmann und Dangelmayr, 1980; Heller und Hahlbrock, 1980; Spribille, 1982). Das Enzym wird folglich nicht mehr mit "Flavanonsynthase", sondern mit Chalkonsynthase (CHS) bezeichnet.

Die CHS konnte in einer Reihe weiterer Systeme nachgewiesen und z.T. auch isoliert werden (nach Grisebach, 1980): z.B. in Haplopappus gracilis, Brassica oleracea, Glycine max, Tulipa cv. "Apeldoorn", ferner in Daucus carota (Hinderer, 1982), Anthirrhinum majus (Spribille und Forkmann, 1982) und in Matthiola incana (Spribille und Forkmann, 1981). Die CHS wird der Enzym-Gruppe II zugerechnet (Hahlbrock et al., 1976), die in Petersilie-Zellsuspensionskulturen etwa 12 weitere Enzyme umfasst (Hahlbrock, 1981).

Die Flavonoidbiosynthese findet oftmals in ganz bestimmten Entwicklungsstadien einer Pflanze, eines Organs oder Teilen eines Organs statt (Wiermann, 1981). Die Regulation der an diesen Synthesevorgängen beteiligten Enzyme ist darum von besonderem Interesse. Es sind dies die Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels (Gruppe I) und die Enzyme der eigentlichen Flavonoidbiosynthese (Gruppe II) (Hahlbrock et al., 1976).

Petersilie-Zellsuspensionskulturen erwiesen sich als besonders geeignet, Fragen der Regulation der Flavonoidbiosynthese zu klären: In Abhängigkeit äusserer Stimuli wie Verdünnung, Belichtung oder Elicitor-Behandlung wurde der zeitliche Verlauf der Enzymaktivitäten von Enzymen der Gruppen I und II verfolgt (Hahlbrock et al., 1980). Durch Verdünnung der Suspensionszellen in frisches Medium oder Wasser wurden die Gruppe I-Enzyme koordiniert induziert, nicht jedoch die Enzyme der Gruppe II (Hahlbrock und Wellmann, 1973; Hahlbrock und Schröder, 1975). Durch Belichtung mit UV-Licht wurden dagegen sowohl die Gruppe I-Enzyme als auch die Gruppe II-Enzyme spezifisch induziert (Hahlbrock et al., 1976). Für die PAL und die CHS (als Vertreter der Gruppe I bzw. II) konnte gezeigt werden, dass die lichtinduzierten Aktivitätsänderungen durch die zeitweilig erhöhte Rate der de novo-Synthese der Enzyme bedingt sind (Schröder et al., 1979). Phytochrom (Wellmann und Schopfer, 1975) und ein separater Blaulicht-Rezeptor (Duell-Pfaff und Wellmann, 1982) sind an der Regulation der UV-induzierten Flavonoidsynthese in Petroselinum-Zellkulturen beteiligt. Durch Elicitor-Behandlung von Petersilie-Zellen werden die Enzyme der Gruppe I induziert (Hahlbrock et al., 1981). In Zellsuspensionskulturen von Glycine max (Hille et al., 1982) und von Phaseolus vulgaris (Lawton et al., 1983a und b) wird dadurch sowohl die Synthese der PAL als auch die der CHS induziert. Für Phaseolus werden auch post-translationelle Kontrollen der Enzymaktivitäten diskutiert.

Die Enzyme, die zur Gruppe I gezählt werden (aufgrund ihrer gemeinsamen Regulation in Petersilie-Zellsuspensionskulturen), müssen nicht in jedem Fall koordiniert reguliert werden, wie das Beispiel von Daucus carota-Zellsuspensionskulturen bei Induktion mit L-AOPP zeigt (Noé und Seitz, 1982).

1.3 Matthiola incana

Viele Probleme in der Biologie lassen sich nur durch das Finden eines überschaubaren Modellsystems lösen, das einer experimentellen Untersuchung zugänglich ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Expression pflanzlicher Gene am Beispiel der Flavonoidbiosynthese untersucht werden.
Eine wichtige und gut untersuchte Flavonoidklasse stellen die Anthocyane dar. Die Levkoje, Matthiola incana R.Br. (Brassicaceae), hat sich als sehr geeignet erwiesen, Fragen der Genexpression im Zusammenhang mit der Anthocyanbiosynthese zu klären. Der Grund dafür ist, dass von Matthiola Linien zur Verfügung stehen, die bezüglich der Anthocyanbiosynthese genetisch definiert sind (Seyffert, 1971). Die Blüten der Wildtyp-Linien 01 bis 16 sind anthocyanhaltig, während die Linien 17, 18 und 19 weissblühend sind. In den weissblühenden Mutanten ist die Anthocyansynthese an unterschiedlichen Stellen blockiert (vgl. 2.1.1).
Matthiola incana wird seit Jahren in Tübingen intensiv untersucht, vor allem auf dem Gebiet der Anthocyanbildung (Seyffert, 1960, 1963, 1983; Hemleben, 1981) und der daran beteiligten Enzyme (Forkmann, 1977, 1979, 1980, 1981; Seyffert, 1982). Im molekularen Bereich liegen Ergebnisse vor zu den Komplexen Genübertragung (Hemleben et al., 1975; Gradmann-Rebel und Hemleben, 1976; Leber und Hemleben, 1979), Genomorganisation (Wenzel, 1980) und Expression von mRNS/Proteinen (Gollmer, 1980; Wenzel und Hemleben, 1982b). Das CHS-Gen soll mit Hilfe eines cDNS-Klons für Petersilie-CHS isoliert und charakterisiert werden (Hemleben et al., 1982b).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Fragen der Expression pflanzlicher Gene am Beispiel der Anthocyanbiosynthese in Matthiola incana. Untersucht wurden Keimlinge, Blüten und Kalluskulturen der Levkoje. Die Produkte der Gene für die PAL und für die CHS sollten nachgewiesen und charakterisiert werden. Besondere Berücksichtigung fand dabei:

- die genetische Grundlage der Genexpression, also der Zusammenhang zwischen Genexpression und Genotyp.
  Dies wurde am Beispiel der CHS untersucht, da für PAL keine Mutanten verfügbar sind (PAL-Mutationen sind vermutlich letal).
  Linie 18 (ff; f=CHS-Gen) ist eine normalerweise weissblühende CHS-Mutante, in der bislang keine CHS-Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte (Spribille und Forkmann, 1981). Besondere Beachtung fand die Linie deshalb, weil sie unter bestimmten Stressbedingungen deutlich lila gefärbte Petalen ausbildet, was auf eine aktive CHS hindeuten würde. In dieser Linie erschien es deshalb besonders wichtig, nach dem Produkt des CHS-Gens zu suchen.

- die Regulation der Genexpression in Abhängigkeit genetischer "Blocks".
  Mit den Linien 17, 18 und 19 stehen weissblühende Mutanten zur Verfügung, in denen die Anthocyansynthese an unterschiedlichen Stellen blockiert ist. Linie 18 weist eine "frühe" Unterbrechung (Chalkonsynthase, Gen f) auf, während in den Linien 17 und 19 die Unterbrechung "später" liegt (Gene e bzw. g; vgl. 2.1.1). Diese Voraussetzungen wurden benützt, um herauszufinden, ob die Expression der PAL und der CHS in den Matthiola-Linien unterschiedlich reguliert wird, je nachdem, ob die betreffende Linie keine, eine "frühe" oder eine "späte" Unterbrechung dieses Syntheseweges aufweist.

- die Genexpression in Abhängigkeit von äusseren Signalen am Beispiel der Induktion von PAL-Enzymaktivität durch Licht.

- die Genexpression während pflanzlicher Entwicklungsvorgänge am Beispiel der Expression des CHS-Gens während der Blütenentwicklung.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Matthiola-Genetik

Für die Anthocyanausprägung bei der Levkoje sind drei komplementär wirkende Gene notwendig: f, e und g (Kappert, 1949; Tabelle 1). Die farbigblühenden Linien 01 bis 16 sind vom Genotyp $f^+f^+e^+e^+g^+g^+$. Durch chemogenetische Untersuchungen weissblühender Linien mit rezessiven Allelen an den Loci e oder g (Linie 17 oder 19) wurden die Gene e und g im Anthocyanbiosyntheseweg nach der Bildung der Dihydroflavonole, jedoch vor der Bildung der Anthocyane lokalisiert (Forkmann, 1977). Dagegen führt das Vorhandensein rezessiver Allele am Locus f zum Ausfall der Chalkonsynthase-Enzymaktivität (Spribille und Forkmann, 1981) und damit ebenfalls zu weissen Petalen (Linie 18).
Die Gene b, l, u und v sind für die Modifikation des Anthocyanmoleküls verantwortlich (Abb. 4). Gen b kontrolliert dabei die Einführung der 3'-Hydroxylgruppe am Ring B (Forkmann et al., 1980) und trifft somit die Entscheidung zwischen der Synthese von Pelargonidin (in den bb-Linien) oder Cyanidin (in den b^+b^+-Linien). Die Gene l, u und v sind für die Glycosidierung bzw. Acylierung des Flavonoidgrundgerüsts verantwortlich (Seyffert, 1960, 1962, 1982).

Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden mit den Matthiola-Linien 01-10 und 17-19 durchgeführt.

Tabelle 1: Geno- und Phänotypen der Matthiola incana-Linien 01-19

Linie	Komplementäre Grundfaktoren für Färbung			Modifikatoren für Anthocyane				Farbe der Petalen	
	f	e	g	b	l	u	v		
01	+	+	+	+	+	+	+	leuchtend violett	Cyanidine
02	+	+	+	+	l	+	+	stumpf violett	
03	+	+	+	+	+	u	+	braun violett	
04	+	+	+	+	+	+	v	leuchtend lila	
05	+	+	+	+	l	u	+	stumpf braun violett	
06	+	+	+	+	l	+	v	stumpf lila	
07	+	+	+	+	+	u	v	braun lila	
08	+	+	+	+	l	u	v	stumpf braun lila	
09	+	+	+	b	+	+	+	leuchtend karmin	Pelargonidine
10	+	+	+	b	l	+	+	stumpf karmin	
11	+	+	+	b	+	u	+	braun karmin	
12	+	+	+	b	+	+	v	leuchtend rosa	
13	+	+	+	b	l	u	+	stumpf braun karmin	
14	+	+	+	b	l	+	v	stumpf rosa	
15	+	+	+	b	+	u	v	braun rosa	
16	+	+	+	b	l	u	v	stumpf braun rosa	
17	+	e	+	b	+	+	+	weiss	
18	f	+	+	+	l	+	+	weiss	
19	+	+	g	+	l	u	+	weiss	

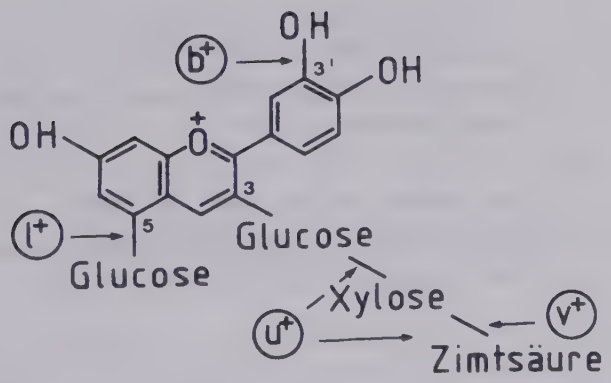


Abb. 4: Die modifizierende Wirkung der Gene b^+, l^+, u^+ und v^+ auf das Flavonoid-Molekül (nach Seyffert, 1960 und 1982).

2.1.2 Matthiola-Blütenstadien

Zur Verwendung kamen Blüten von Pflanzen, die auf dem Versuchsfeld des Lehrstuhls für Genetik, Tübingen, angezogen worden waren.

Die Blütenstadien wurden in Anlehnung an Kittel (1981) wie folgt bezeichnet:

Stadium -1	Kleinstes Knospenstadium. Die Knospe ist vollständig geschlossen, die (ungefärbten) Petalen sind nicht sichtbar.
Stadium 0	Mittleres Knospenstadium. Die Petalenspitzen sind gerade sichtbar, aber noch ungefärbt.
Stadium I	Fortgeschrittenes Knospenstadium. Die Petalenspitzen sind gefärbt.
Stadium II	Die Petalen sind intensiv gefärbt, aber noch fest geschlossen.
Stadium III	Die Petalen lösen sich voneinander, halten jedoch an der Spitze zusammen.
Stadium IV	Die Blüte ist geöffnet, die Petalen stehen in einem Winkel von ca. 90° auf.

2.1.3 Anzucht von Keimlingen

Die Matthiola-Keimlinge wurden grundsätzlich unter sterilen Bedingungen angezogen. Dazu wurden die Samen in einer sterilen Petrischale 1 h lang mit einer Spatelspitze des Fungizids Orthocid (Fa. Merck) geschüttelt und anschliessend achtmal mit sterilem aqua dest. gewaschen. Je etwa 20 Samen wurden mit 400 µl aqua dest. in sterilen Gläschen bei 20°C unter Dauerlicht (ca. 5000 Lux, Weisslicht) oder Dauerdunkel angezogen.

2.1.4 Anzucht von Kalluskulturen

Von den Matthiola-Linien 01-10 sowie 17, 18 und 19 wurden Kalluskulturen angelegt und mehr als 2 Jahre lang aufrechterhalten. Dazu wurden Wurzelspitzen von 4-6 Tage alten, steril angezogenen Keimlingen (2.1.3) in ca. 0,5 mm grosse Stücke geschnitten und mit wenigen Tropfen aqua dest. auf das Nährmedium gespült. Die Anzucht der Kalli erfolgte auf je 100 ml festem Nährmedium (0,8% Agar) in 200 ml-Erlenmeyerkolben bei 26-28°C im Weisslicht (ca. 3000 Lux). Die Kalli wurden parallel auf Gamborg-B_5-Medium (Gamborg et al., 1968) mit 1 mg/l 2,4-D ($4,5 \times 10^{-6}$M) und auf einem Nährmedium nach Seitz und Richter (1970) mit 2 mg/l IES ($1,1 \times 10^{-5}$M), 0,2 mg/l Kinetin ($9,3 \times 10^{-7}$M) und 0,022 mg/l 2,4-D (1×10^{-7}M) (Leweke und Forkmann, 1982) angezogen (2.7.1). Alle 4 Wochen wurden mit ca. 300 mg Kallusgewebe (Frischgewicht) Subkulturen angelegt. Hierbei wurden bei den anthocyanausprägenden Linien (2.1.1) bevorzugt die gefärbten Kallusbereiche weiterverwendet.

2.2 Absorptionsspektren von Keimlingen, Petalen und Kalluszellen

Zum Vergleich der Absorptionsspektren von Keimlingen, Petalen und Kalluszellen, wurden Methanol/HCl-Extrakte des betreffenden Pflanzenmaterials hergestellt.

Dazu wurde die angegebene Menge Material (Frischgewicht) wie folgt mit Methanol/HCl versetzt:

Keimlinge: 0,3 g (Kotyledonen mit dem anschliessenden 0,5 cm langen Hypokotylstück)
+ 5 ml Methanol (1% HCl)
Homogenisation im Glashomogenisator

Petalen: A) 0,2 g (Stadium III-IV; grob zerzupft)
+ 2 ml Methanol/HCl
B) 0,5 g
+ 1 ml Methanol/HCl

Kalli: 2 g
+ 2 ml Methanol/HCl
Homogenisation im Glashomogenisator

Bei der Aufarbeitung von Kalluszellen wurden bei den "farbigen" Linien bevorzugt anthocyanhaltige Kallusbereiche verwendet. Die Proben wurden dicht verschlossen 24 h (Keimlinge 48 h) bei 6°C im Dunkeln geschüttelt und anschliessend zentrifugiert (Christ Minifuge, 10 min, 5 000 rpm). Von dem jeweiligen Methanol-Überstand wurde gegen Methanol/HCl ein Absorptionsspektrum aufgenommen für Wellenlängen zwischen 250 und 800 nm (Spektralphotometer Uvikon 820, Fa. Kontron).

2.3 PAL-Induktion durch Licht in Keimlingen und Kalluskulturen

2.3.1 Induktion

Zum Nachweis der Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5) durch Licht, wurden Matthiola-Keimlinge 12-19 Tage im Dauerdunkel steril angezogen (2.1.3).

Die anschliessende Belichtung erfolgte mit Weisslicht (ca. 5000 Lux). Nach unterschiedlichen Belichtungszeiten wurden die Keimlinge aufgearbeitet (2.3.2) und der Rohextrakt unmittelbar anschliessend auf PAL-Enzymaktivität getestet (2.3.4).

Für Lichtinduktions-Versuche mit Matthiola-Kalli wurden diese auf Gamborg-B_5-Medium (Gamborg et al., 1968) mit 2 mg/l IES ($1{,}1 \times 10^{-5}$M), 0,2 mg/l Kinetin ($9{,}3 \times 10^{-7}$M), 0,1 mg/l 2,4-D ($4{,}5 \times 10^{-7}$M) und 0,1 mg/l L-Phenylalanin ($6{,}1 \times 10^{-7}$M) (Medium C; 2.7.1) 16 Tage lang in Polystyrol-Petrischalen auf 25 ml festem Nährmedium im Dauerdunkel bei 26-28°C angezogen. Die anschliessende Belichtung erfolgte mit Weisslicht (ca. 3000 Lux). Der Test auf PAL-Enzymaktivität wurde sofort nach Ablauf der jeweiligen Belichtungszeit vorgenommen (2.3.4).

2.3.2 Aufarbeitung der Keimlinge

Für die Aufarbeitung der Keimlinge wurde eine modifizierte Methode nach Rissland und Mohr (1967) verwendet. Alle Schritte wurden bei 6°C durchgeführt. 0,5 g Keimlinge (Frischgewicht; Kotyledonen und ca. 0,5 cm des anschliessenden Hypokotylgewebes) wurden mit 3 ml 0,1 M Borsäure-Borax-Puffer, pH 8,8, (71 mM Mercaptoäthanol) und 0,5 g äquilibriertem Dowex 1 x 2 (200-400 mesh) mit einem Schlagmesserhomogenisator (Ultra-Turrax, Fa. Janke & Kunkel) in 3 x 30 sec aufgeschlossen. Das Homogenat wurde 30 min bei 28 000 x g zentrifugiert. Der Überstand diente zur Bestimmung der PAL-Enzymaktivität.

2.3.3 Aufarbeitung der Kalluszellen

Die Aufarbeitung der Kalli entsprach jener für Keimlinge, jedoch wurde 1 g Kallusgewebe (Frischgewicht) mit 1 g Dowex in 3 ml Puffer homogenisiert.

2.3.4 Bestimmung der PAL-Aktivität

Die Bestimmung der PAL-Enzymaktivität erfolgte verändert nach dem optischen Test von Koukol und Conn (1961) und Zucker (1965).
Der Testansatz enthielt 280 µl Rohextrakt und 20 mM L-Phenylalanin in 0,1 M Borsäure-Borax-Puffer, pH 8,8, (71 mM Mercaptoäthanol) in einem Gesamtvolumen von 980 µl. Nach einer Vorinkubation (30-60 min, 38°C), wurde mindestens 2 h lang alle 10 min bei 290 nm die Zunahme an trans-Zimtsäure bei 38°C in einem Zeiss PMQ 3-Spektralphotometer verfolgt. Als Referenz diente ein Testansatz ohne L-Phenylalanin.

2.4 CHS-Enzymaktivität in Blüten

2.4.1 Blüten-Aufarbeitung

Zur Verwendung kamen Petalen, die zunächst in flüssigem Stickstoff, dann bis zu mehreren Monaten bei -20°C eingefroren worden waren. Die Aufarbeitung der Petalen (aus gefüllten Blüten, Stadium III-IV nach 2.1.2) erfolgte verändert nach Spribille (1982): 0,25 g Petalen (Frischgewicht), 0,5 g Quarzsand, 1 g Dowex 1 x 2 (äquilibriert) und 3 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5, (1,4 mM Mercaptoäthanol) wurden bei 6°C im Mörser homogenisiert.

Das Homogenat wurde 5 min lang bei 10 000x g zentrifugiert; dieser Schritt wurde mit dem Überstand wiederholt. Der letzte klare Überstand diente zur Bestimmung der Enzymaktivität.

2.4.2 Bestimmung der CHS-Aktivität

Die Bestimmung der CHS-Enzymaktivität erfolgte verändert nach Kreuzaler und Hahlbrock (1975a) und Spribille und Forkmann (1981). Zu 90 µl verdünntem Rohextrakt (i.a. 45 µl Rohextrakt und 45 µl Kaliumphosphat-Puffer) wurden 5 µl p-Cumaroyl-CoA (Endkonzentration 1 x 10^{-5}M) und 5 µl (2-^{14}C)Malonyl-CoA (Endkonzentration 2,44 x 10^{-5}M) einpipettiert. Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C inkubiert, die Reaktion mit 20 µl unmarkiertem Naringenin / Methanol (Endkonzentration 167 µg/ml) abgestoppt und das Reaktionsgemisch mit 200 µl Äthylacetat ausgeschüttelt. Jeweils 50 µl Äthylacetatphase wurden in 4 ml Unisolve im Packard Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gezählt. Pro Rohextrakt-Probe wurden im allgemeinen zwei Testansätze angelegt.

2.4.3. Indirekter Nachweis aktiver CHS durch Immunpräzipitation

Zum Nachweis der CHS stand uns ein Kaninchen-Antiserum gegen CHS aus Petersilie zur Verfügung (2.8.1). Damit konnte mit einer Methode von Kreuzaler et al. (1979) Matthiola-CHS aus Blüten-Rohextrakten (2.4.1) präzipitiert werden.
Hierzu wurde das Antiserum 2 h lang bei 6°C gegen 250 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5, (1,4 mM Mercaptoäthanol)dialysiert. Häufig mussten dabei kleine Volumina an Antiserum (z.B. 30 µl) dialysiert werden.

Dazu wurde das Antiserum in ein schmales, längliches Eppendorf-Reaktionsgefäss (Inhalt 400 µl) gefüllt, das in der erforderlichen Höhe abgeschnitten wurde. Das Gefäss wurde mit einem Stück Dialyseschlauch und einem Gummischlauch-Ring verschlossen und unter heftigem Rühren im Puffer bewegt.
Für die Immunpräzipitation wurden 45 µl Rohextrakt mit unterschiedlichen Mengen an dialysiertem Antiserum und 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, (1,4 mM Mercaptoäthanol) gemischt (Gesamtvolumen 90 µl). Das Gemisch wurde 45 min auf 26°C und 4-5 h auf 6°C gehalten, 10 min bei 10 000x g zentrifugiert und der "Oberstand" (enthält die nicht präzipitierte CHS) zum CHS-Aktivitätstest (2.4.2) eingesetzt.

2.5 Nachweis von CHS-Enzymprotein durch Protein-Blotting, Immunpräzipitation und PAP-Färbung

2.5.1 Protein-Auftrennung durch SDS-PAGE

2.5.1.1 Blüten-Aufarbeitung

Um konzentrierte Rohextrakte zu erhalten, wurden die Blüten (i.a. Stadium III-IV) wie unter (2.4.1) beschrieben aufgearbeitet:

Aufarbeitung 1:	0,25	g	eingefrorene Petalen (Frischgewicht) bzw. Blätter
	0,5	g	Quarzsand
	1,2	ml	0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5, (1,4 mM Mercaptoäthanol)

oder

Aufarbeitung 2:	2,5	g	eingefrorene Petalen (Frischgewicht)
	1,0	g	Quarzsand
	2	ml	Kaliumphosphat-Puffer

Sollten die Rohextrakte nach Aufarbeitung 2 noch stärker konzentriert werden, wurden sie in einem Stück Dialyseschlauch für 2 h bei 6°C in Sephadex G-100 eingebettet (Schleif und Wensink, 1981). Danach wurde das Volumen der Proben mit Kaliumphosphat-Puffer auf 600 µl eingestellt (= Aufarbeitung 3).
Bis zur Durchführung einer Proteinbestimmung (2.6), wurde ein Aliquot jedes Extrakts bei -20°C eingefroren.

2.5.1.2 Aufarbeitung von Kalluszellen

Die grundlegende Beobachtung, die zu diesen Untersuchungen anregte, war jene, dass Kalluszellen der Linien 01 bis 10 im Dauerlicht auf Medium A (2.7.1) ab ca. dem 14. Tag einer Kulturperiode Anthocyanbildung zeigen. Es erschien daher sinnvoll, CHS-Enzymprotein in solchen gefärbten Kalli, in lichtinduzierten Kalli und vergleichsweise in stark anthocyanhaltigen Kalluskulturen von Daucus carota mittels des CHS-Antiserums (2.8.1) und einer PAP-Färbung (2.5) nachzuweisen.
Um hierzu Protein-Rohextrakte zu erhalten, wurde die Aufarbeitung nach (2.5.1.1) wie folgt für die einzelnen Objekte variiert:

a) 07-Kalli, Tag 19 (Dauerlicht), anthocyanhaltig

1,3 g Frischgewicht
0,5 g Quarzsand
1,2 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5, (1,4 mM Mercaptoäthanol)

b) 07-Kalli, lichtinduziert, z.T. anthocyanhaltig (s.u.)

3,0-3,5 g Frischgewicht
0,5 g Quarzsand
1,5 ml Puffer

2 h Konzentrierung des Rohextrakts in Sephadex G-100 (2.5.1.1)

Die Kalli wurden 14 Tage im Dunkeln auf Medium A (2.7.1) in Polystyrol-Petrischalen angezogen und dann mit Weisslicht (ca. 3000 Lux) belichtet. 7 Tage später konnte Anthocyanbildung beobachtet werden. Die Proben (die Zellen von jeweils 2 Platten) wurden am 1., 4., 6. und 8. Tag nach Lichtbeginn entnommen.

c) Daucus carota-Kalli, stark anthocyanhaltig

1) 2,5 g Frischgewicht
1,0 g Quarzsand
2,0 ml Puffer

2) 10 g Frischgewicht
5 g Quarzsand
2 g Dowex 1 x 2
3 ml Puffer

An Aufarbeitung 1) und 2) wurde gegebenenfalls eine Ammoniumsulfatfällung (85% $(NH_4)_2SO_4$) angeschlossen. Die Probe wurde an Tag 20 einer Kulturperiode entnommen, dem Zeitpunkt maximaler CHS-Enzymaktivität (Hinderer, 1982).

2.5.1.3 Denaturierung der Proteine

Die Proteine wurden nach Laemmli (1970) denaturiert. Dazu wurden 80 µl Rohextrakt und 20 µl (5x) Probenpuffer im Wasserbad erhitzt, 2 min gekocht und mit 2 µl 1% Bromphenolblau versetzt. Entsprechend wurden 40 µl eines Marker-Gemisches behandelt (ca. 46 µg low molecular weight proteins; Fa. Pharmacia), welches 6 Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 14 400 und 94 000 enthält (α-Lactalbumin, Soja Trypsin Inhibitor, Carboanhydrase, Ovalbumin, Rinderserumalbumin, Phosphorylase b).

2.5.1.4 SDS-Disk-Elektrophorese

Die nach (2.5.1.1) bis (2.5.1.3) hergestellten Rohextrakte wurden auf 10% SDS-Polyacrylamidgelen (110 x 90 x 1,5 mm) mit 3%igem Sammelgel in einem Tris-Glycin-Puffersystem aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die vertikalen Trennzellen (System Havanna, Fa. Desaga) wurden unten mit einer Cyanogum-Schicht abgedichtet. Pro Geltasche wurden 100 µl denaturierter Rohextrakt oder 50 µl Marker-Gemisch aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte 30 min lang bei 70 V (ca. 70 mA) und anschliessend über 16 h bei 20 V (ca. 20 mA).

Gegebenenfalls wurden die Gele mit Serva Blau G gefärbt (1 h, 65°C) und 24 h unter Schütteln bei Raumtemperatur entfärbt. Aus Gelen, die einem Transfer (2.5.2) unterworfen wurden, wurde nur die Marker-Spur ausgeschnitten und gefärbt. Anhand der Laufstrecken der Marker-Proteine (2.5.1.3), wurden die Molekulargewichts-Bestimmungen von Banden in Gelen und auf Nitrocellulosefiltern durchgeführt.

2.5.2 Protein-Blotting

Zum Nachweis der CHS (bzw. der PAL, vgl. 2.5.3) in den aufgetrennten Extrakten, wurde die Gesamtheit der Proteine aus einem 10% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf Nitrocellulose transferiert (verändert nach Towbin, 1979), da der direkte Nachweis im Gel (Olden und Yamada, 1977) und Western-Blots zu keinem Erfolg führten. Das (ungefärbte) Gel wurde bis zu einem Transfer in Transfer-Puffer bei 6°C aufbewahrt. Die Transfer-Einheit wurde wie folgt (Abb. 5) zusammengebaut:

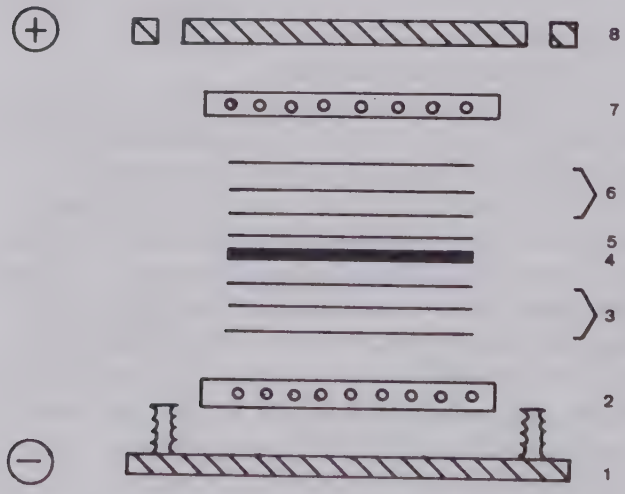


Abb. 5: Protein-Transfer-Einheit (Querschnitt). Die Lagen 1 bis 8 werden in dieser Reihenfolge Luftblasen-frei aufeinandergelegt. Die untere Stahlplatte (18x20cm) besitzt Schrauben in den Ecken, die obere an den entsprechenden Stellen Löcher. Durch 4 Muttern wird der Abstand der Platten zuletzt auf 2 cm eingestellt. Die Einheit wird zum Transfer vertikal in einen Puffertrog mit ca. 3,5 l Transfer-Puffer gestellt und an die Stahlplatten Spannung angelegt.

1 Stahlplatte mit Schrauben
2 Schwamm
3 3 Lagen Whatman 3MM - Papier
4 Gel
5 Nitrocellulose, in Trenngel-Grösse
6 3 Lagen Whatman 3MM - Papier
7 Schwamm
8 Stahlplatte mit Löchern

Der Schwamm (13 x 17 cm) bestand aus einem Stück Luftfilter-Material für Dunstabzugshauben und wurde wie das Whatman-Papier (12 x 12 cm) und die Nitrocellulose vor dem Gebrauch in Transfer-Puffer eingeweicht. Der Transfer erfolgte bei 6°C mit 0,4 A für 1,5 h unter ständigem Rühren des Puffers.

2.5.3 PAP-Methode

Das Nitrocellulose-Filter mit den nach (2.5.2) transferierten Proteinen wurde 1,5 h in 100 ml PBS (0,1% BSA, 0,05% Triton X-100) und 3 h in 100 ml PBS (1% BSA) bei Raumtemperatur geschüttelt, um das Filter an allen noch nicht mit Protein "besetzten" Stellen mit BSA abzudecken. Die Lokalisation der CHS auf dem Filter erfolgte mittels einer PAP (Peroxidase Anti-Peroxidase)-Färbung (Sternberger, 1979). Abb. 6 verdeutlicht das Prinzip.

Das Filter wurde bei Raumtemperatur geschüttelt in:

1. 5 ml verdünntem Kaninchen-Antiserum gegen Petersilie-CHS (16 h). Das Antiserum war 1:500 in PBS (0,1% BSA) verdünnt
2. je 100 ml PBS (0,1% Triton X-100) unter mindestens viermaligem Wechsel der Waschlösung (insgesamt 1 h)
3. 5 ml verdünntem Ziegen-Antiserum gegen Kaninchen-IgG (GAR), Verdünnung 1:100 in PBS (0,1% BSA) (1 h)
4. entspricht 2.
5. 5 ml verdünnter Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP), Verdünnung 1:250 in PBS (0,1% BSA) (1 h)
6. entspricht 2.

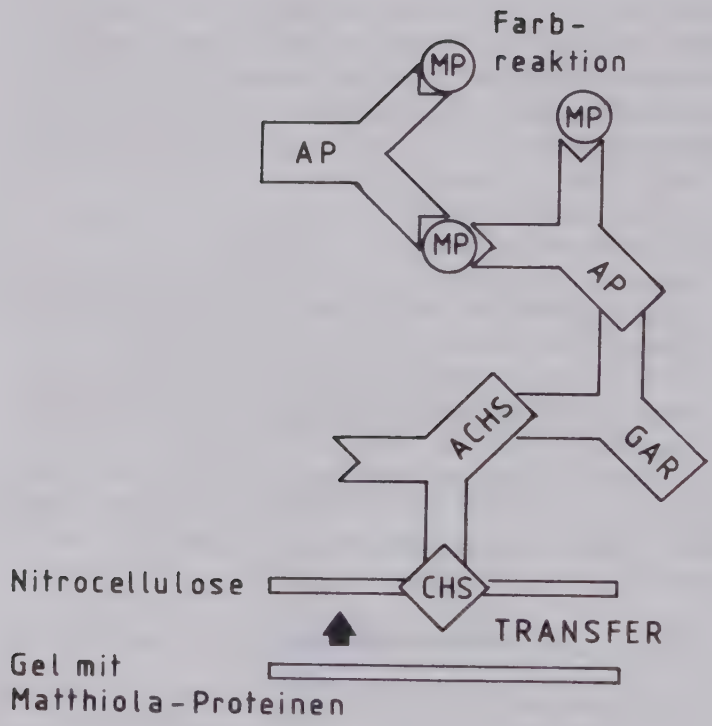


Abb. 6: PAP-Methode. Die auf ein Nitrocellulosefilter transferierte CHS wird durch eine Peroxidase-Reaktion lokalisiert; an dieser Stelle entsteht eine bräunlich-violette Färbung. Die Peroxidase ist über drei verschiedene Antikörper an die CHS gekoppelt.

ACHS ("Anti-CHS") = Kaninchen-Antiserum gegen Petroselinum-CHS

GAR ("Goat Anti-Rabbit") = Ziegen-Antiserum gegen Kaninchen-IgG

PAP { AP ("Anti-Peroxidase") = Kaninchen-Antiserum gegen Meerrettich-Peroxidase, bereits gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase
MP

PAP Peroxidase Anti-Peroxidase Komplex

Bei den Schritten 1, 3 und 5 wurde das Filter mit der entsprechenden Lösung in Plastikfolie eingeschweisst. Anschliessend wurde das Filter in 20 ml frisch hergestellter Chloro-Naphthol/H_2O_2-Lösung eingelegt. Bei positiver Reaktion erschien innerhalb weniger Minuten eine bräunlich-violette Färbung. Die Farbreaktion wurde durch Waschen des Filters in PBS gestoppt und das Filter zwischen Papierhandtüchern getrocknet. Nach dem gleichen Prinzip wurde mit einem Kaninchen-Antiserum gegen Petersilie-PAL (2.8.1) PAL-Enzymprotein in Matthiola-Petalen und -Kalluszellen nachgewiesen.

2.6 Proteinbestimmungen

Proteinbestimmungen wurden nach Lowry et al. (1951) durchgeführt, dabei wurden immer Doppelproben vermessen.

Für die SDS-PAGE wurde auf die Verwendung von Dowex 1 x 2 bei der Blütenaufarbeitung (2.5.1.1) verzichtet, um konzentriertere Rohextrakte zu erhalten. Dies hatte jedoch im Fall der Linien 01-10 eine Färbung der Extrakte zur Folge. Die Extrakte wurden deshalb vor einer Proteinbestimmung zweimal 3 min mit Dowex (0,1 g/400 µl) geschüttelt, zweimal 5 min bei 10 000x g zentrifugiert und der letzte, farblose Überstand zu (relativen) Proteinmessungen eingesetzt. Sollte ein Vergleich mit Rohextrakten aus weissen Blüten durchgeführt werden, wurden auch diese entsprechend behandelt.

2.7 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

2.7.1 Kulturmedien für Kalluskulturen

Die verwendeten Medien basieren auf dem I 2a-Medium nach Seitz und Richter (1970) und auf dem Gamborg-B_5-Medium (Gamborg et al., 1968).

Zusammensetzung der Medien (in mg/l):		I 2a	G-B_5
Lösung I	$(NH_4)_2SO_4$	-	126,0
	KNO_3	1 900,0	2 100,0
	NH_4NO_3	1 650,0	-
	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	440,0	150,0
	$MgSO_4 \times 2(7)\ H_2O$	370,0	250,0
	$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	-	110,0
	$KH_2PO_4 \times 2\ H_2O$	170,0	-
Lösung II	H_3BO_3	6,2	3,0
	$MnSO_4 \times 4(1)\ H_2O$	22,9	10,0
	$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	8,6	2,0
	KJ	0,83	0,25
	$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	0,25	0,75
	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,025	0,039
	$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	0,025	0,025

Zusammensetzung der Medien (in mg/l):		I 2a	G-B_5
"Vitamine"	Nicotinsäure	0,5	1,0
	Thiamindichlorid	0,1	10,0
	Pyridoxalhydrochlorid	0,1	1,0
	meso-Inosit	100,0	10,0
	Sequestren 138	-	28,0
	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	27,8	-
	Na_2EDTA	37,2	-
	Saccharose	30 000,0	20 000,0
	Hormone s.u.		

"Aminosäuren"

Das I 2a-Medium enthielt ausserdem die L-Formen der folgenden Aminosäuren (Angaben in mg/l): Alanin (29,7), γ-Aminobuttersäure (26,0), Asparagin, NH_2 (3,8), Asparaginsäure (1,7), Arginin-HCl (3,1), Cystein (3,0), Glutamin, NH_2 (0,3), Glutaminsäure (15,7), Glycin (2,7), Histidin (0,05), Leucin (5,0), Lysin,HCl (2,0), Methionin (0,2), Phenylalanin (0,05), Prolin (1,9), Serin (12,8), Threonin (4,1), Tyrosin (0,05) und Valin (2,4).

Die Medien enthielten die folgenden Hormone:					Verwendung für:
A	I 2a	2,0 0,2 0,022	mg/l mg/l mg/l	IES Kinetin 2,4-D	Dauerkultur
B	Gamborg-B_5	1,0	mg/l	2,4-D	Dauerkultur
C	Gamborg-B_5 mit L-Phe (o,1 mg/l)	2,0 0,2 0,1	mg/l mg/l mg/l	IES Kinetin 2,4-D	Induktionsversuche

Die Lösungen I, II, Sequestren, $FeSO_4$ und Na_2EDTA wurden in Form konzentrierter Stammlösungen hergestellt. "Vitamine", "Aminosäuren" und Hormone (einzeln) wurden ebenfalls konzentriert angesetzt, sterilfiltriert und portionsweise bei -20°C eingefroren.

Das Medium wurde aus den Lösungen I, II, "Vitamine", Sequestren (G-B_5) und "Aminosäuren" (I 2a) gemischt, mit dest. H_2O auf das Endvolumen gebracht und darin die Saccharose gelöst. Vor dem Autoklavieren (20 min, 120°C, 0,9 atü) wurde der pH-Wert mit 0,1 N KOH auf 5,6 (I 2a) bzw. 5,7 (G-B_5) eingestellt und Agar zugefügt. Die Hormon-, Na_2EDTA- und $FeSO_4$-Lösungen (I 2a) wurden gemischt, sterilfiltriert und dem autoklavierten, handwarmen Medium zugesetzt.

2.7.2 Puffer und Lösungen

(2.3): Borsäure-Borax-Puffer, pH 8,8

A 0,1 M $Na_2B_4O_7 \times 10\ H_2O$
B 0,4 M H_3BO_3
0,1 M NaCl

67,2 Volumenteile A + 32,8 Volumenteile B ergibt pH 8,8

(2.5): Elektrophorese-Puffer, pH 8,3

0,025 M Tris
0,192 M Glycin
0,1 % SDS (w/v)

Acrylamid-Stammlösung

30 % Acrylamid
0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid
(w/v) in H_2O

2x-Trenngel-Puffer

0,75 M Tris-HCl pH 8,8
0,2 % SDS (w/v)

6x-Sammelgel-Puffer

0,75 M Tris-HCl pH 6,8
0,6 % SDS (w/v)

"Cyanogum"-Schicht

0,75 g "Cyanogum" (96% Acrylamid (w/w), 4% N,N'-Methylenbisacrylamid)
5 ml Elektrophorese-Puffer
10 µl TMED
kleine Spatelspitze Ammoniumpersulfat

10%iges Trenngel

Für 50 ml:
16,7 ml Acrylamid-Stammlösung
25 ml 2x-Trenngel-Puffer
8,3 ml H_2O
70 µl TMED
85 µl 10% Ammoniumpersulfat (w/v, Endkonzentration 0,017%)

3%iges Sammelgel

Für 20 ml:

2,0 ml	Acrylamid-Stammlösung
3,3 ml	6x-Sammelgel-Puffer
14,6 ml	H_2O
20 µl	TMED
100 µl	10% Ammoniumpersulfat (Endkonzentration 0,05%)

5x-Probenpuffer

0,31 M	Tris-HCl pH 6,8
10 %	SDS (w/v)
50 %	Glyzerin (v/v)
25 %	2-Mercaptoäthanol (v/v)

Färbelösung

0,44 g	Serva Blau G
230 ml	Methanol/H_2O (1:1)
20 ml	Essigsäure

Entfärber

10% Essigsäure (v/v)
30% Methanol
60% H_2O

Transfer-Puffer

0,025 M	Tris
0,192 M	Glycin
20 %	Methanol (v/v)

10x-PBS-Stammlösung pH 7,1

1,37 M	NaCl
30 mM	KCl
10 mM	KH_2PO_4
60 mM	Na_2HPO_4

Chloro-Naphthol/H_2O_2-Lösung

Für 20 ml:

3,3 ml	= 1 Volumenteil 4-Chloro-1-Naphthol (3 mg/ml, in Äthanol)
16,7 ml	= 5 Volumenteile 0,1 M Tris-HCl pH 7,5
10 µl	30% H_2O_2

2.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2.8.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Fa. Merck (Reinheitsgrad p.a.) verwendet.

Acrylamid (krist. reinst; für Cyanogum)	Fa. Serva
Acrylamid (2xkrist. p.a.)	Serva
Ammoniumpersulfat (p.a.)	Serva
Ammoniumsulfat (p.a.)	Serva
Bacto-Agar	Difco
Bisacrylamid (N,N'-Methylenbisacrylamid, 2xkrist. reinst)	Serva
BSA (Albumin, Bovine, Fraction V)	Sigma
4-Chloro-1-Naphthol	Sigma
2,4-D	Serva
Dowex 1 x 2 (200-400 mesh)	Serva
GAR (IgG fraction of anti-rabbit IgG, prepared in goat; lyophilisiert)	Miles
Kinetin (p.a.)	Serva
2-Mercaptoäthanol	Serva
meso-Inosit	Sigma
PAP (Horseradish Peroxidase Anti-Peroxidase Complex)	Miles
Pyridoxalhydrochlorid	Sigma
SDS	Serva
Sephadex G-100	Pharmacia
Sequestren 138	Ciba-Geigy
Serva Blau G	Serva
Thiamindichlorid	Sigma
TMED	Serva
Triton X-100	Serva
Unisolve	Koch Light Laboratories LTD.

Naringenin (1 mg/ml, in Methanol) und p-Cumaroyl-CoA (0,2 mM) waren ein Geschenk der Arbeitsgruppe Forkmann (Tübingen).

(2-^{14}C)Malonyl-CoA (60 Ci/mol) wurde von Amersham-Buchler bezogen und auf 26 Ci/mol verdünnt.

PAP wurde dankenswerterweise von Dr. R. Stick (Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Von Prof. K. Hahlbrock (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) erhielten wir freundlicherweise das Kaninchen-Antiserum gegen gereinigte Petroselinum-CHS (131/2/39; Kreuzaler et al., 1979). Das Kaninchen-Antiserum gegen gereinigte Petroselinum-PAL (592/2/6); Schröder et al., 1976) stammte ebenfalls von Prof. K. Hahlbrock und wurde dankenswerterweise von Prof. H.-U. Seitz (Tübingen) zur Verfügung gestellt. Das unspezifische Kaninchenserum erhielten wir freundlicherweise von Prof. W. Bessler (Tübingen).

2.8.2 Verbrauchsmaterial

Membranfilter BA 85 0,45 µm, Fa. Schleicher & Schüll
Nitrocellulose HA 0,45 µm, Fa. Millipore (Kat.Nr. HAHY 304 F0)
Polystyrol-Petrischalen Ø 8,5 cm, Fa. Greiner (Nürtingen)
Visking-Dialysierschlauch Typ 8/32, Fa. Serva
Whatman 3MM Chromatographie Papier

2.9 Abkürzungen

A	Ampère
A ...	Absorption bei ... nm
BSA	Rinderserumalbumin
CHS	Chalkonsynthase
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
d	Tage
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung, 9,81 m/sec²
GAR	"Goat Anti-Rabbit" (= IgG fraction of anti-rabbit IgG, prepared in goat)
G-B_5(-Medium)	Gamborg-B_5(-Medium)

h	Stunde
IES	Indolessigsäure-(3)
kat	katalytische Einheit
M	Molarität
mA	Miliampère
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mRNS	Messenger RNS
N	Normalität
nm	Nanometer
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PAP	Peroxidase Anti-Peroxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline
Phe	Phenylalanin
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNS	ribosomale RNS
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
t	Zeit
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	"volume per volume" (Volumenprozent)
w/v	"weight per volume" (Gewichtsprozent, bezogen auf das Volumen)
w/w	"weight per weight" (Gewichtsprozent)

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der Versuchssysteme

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit verschiedenen Linien von Matthiola incana durchgeführt, die hinsichtlich der Anthocyansynthese genetisch definiert sind (2.1.1) und einen weitgehend isogenen Hintergrund besitzen. Es wurden die folgenden experimentellen Systeme gewählt:

Matthiola-Keimlinge,
Matthiola-Blüten und
Matthiola-Kalluskulturen.

Die Gründe für die Auswahl dieser Systeme waren

1) Das Schlüsselenzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels, die PAL, und das Schlüsselenzym der eigentlichen Flavonoidbiosynthese, die CHS, sollten in pflanzlichen Systemen unterschiedlicher Komplexität charakterisiert werden. Mit Keimlingen stehen intakte Pflanzen zur Verfügung, die sich allgemein in einem Zustand hoher Syntheseleistung befinden. Petalen aus Matthiola-Blüten stellen pflanzliche Organe dar, die während des Aufblühens der Knospe erhebliche Mengen an Anthocyanen ausbilden können, dabei aber nicht steuerbaren Freiland-Umweltbedingungen unterliegen. Kalluskulturen repräsentieren ein hinsichtlich der Umweltbedingungen standardisiertes pflanzliches System relativ geringer Komplexität; sie bestehen im Idealfall aus physiologisch und genetisch homogenen Zellen. Es sollte versucht werden, die genannten Enzyme in allen drei Systemen bezüglich ihres Vorkommens und ihrer Regulation zu untersuchen.

2) Die ständige Versorgung mit pflanzlichem Versuchsmaterial musste gewährleistet sein. Matthiola-Blüten standen in grösseren Mengen nur während der Sommermonate zur Verfügung. Die Anzucht von Keimlingen konnte dagegen unabhängig von der Vegetationsperiode unter standardisierten Umweltbedingungen vorgenommen werden, jedoch war die Menge an verfügbarem Samenmaterial begrenzt. Die Kalluskulturen konnten demgegenüber ständig im gewünschten Umfang vermehrt werden.

Bei der Anzucht von Keimlingen wurde beobachtet, dass die Geschwindigkeit des Keimens, die Lebensfähigkeit und der Habitus der Keimlinge je nach der verwendeten Linie erheblich verschieden waren. Abb. 7 zeigt dies am Beispiel der Keimfähigkeit gleich alter Samen im Dauerdunkel bei 20°C. Ähnliche Ergebnisse wurden unter Dauerlicht-Bedingungen gefunden. Somit sind Altersangaben zur Bezeichnung des Entwicklungsstadiums von Keimlingen nur innerhalb e i n e r Linie aussagekräftig. Umgekehrt sind Keimlinge gleichen Alters aber unterschiedlicher Linien bezüglich ihres Entwicklungsstadiums schlecht vergleichbar.

Kalluskulturen wurden von den Matthiola-Linien 01-10, 17, 18 und 19 etabliert (2.1.4). Auf den verwendeten Nährmedien (2.7.1) wuchsen in gleicher Weise lockere, helle, optische homogene und sich rasch vermehrende Kalluszellen. Selten wurde die Ausbildung von Wurzelhaaren und/oder Chlorophyll beobachtet.

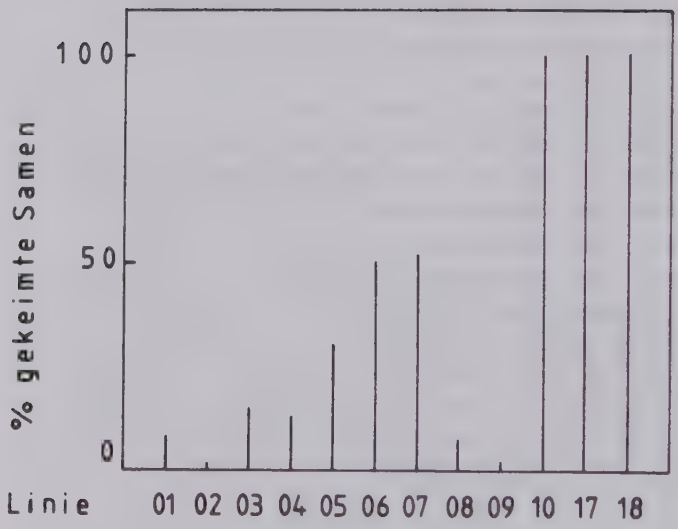


Abb. 7: Keimfähigkeit verschiedener Matthiola-Linien im Dauerdunkel. 14 Tage nach Anzucht-Beginn (ca. 150 Samen/Linie) wurde die Zahl der gekeimten Samen festgestellt.

3.2 Nachweis der Anthocyansynthese in Keimlingen, Blüten und Kalluszellen

Um die Eignung der drei Versuchssysteme (3.1) für die folgenden Untersuchungen festzustellen, wurden sie auf ihre Fähigkeit geprüft, Anthocyane synthetisieren zu können. Als schnelle und aussagekräftige Methode wurden hierfür von Methanol/HCl-Extrakten des betreffenden Materials Absorptionsspektren erstellt (2.2).

3.2.1 Keimlinge

Abb. 8a zeigt exemplarisch ein Absorptionsspektrum für Dauerlicht-Keimlinge (2.1.3) der Linien 06, 07 und 17, 9 Tage nach Keimungsbeginn. 06- und 07-Keimlinge müssten aufgrund ihres b^+b^+- Genotyps zur Synthese von Cyanidin-Abkömmlingen fähig sein, während die 17-Keimlinge (Genotyp ee) eine Unterbrechung in der Anthocyanbiosynthesekette aufweisen (vgl. 2.1.1). Abb. 8a zeigt, dass die Anthocyansynthese in Matthiola-Keimlingen den genannten genetischen Kontrollen unterliegt. Die Spektren der Linien 06 und 07 weisen im relevanten Bereich übereinstimmend ein deutliches Absorptionsmaximum bei 530 nm auf. Dies demonstriert das Vorhandensein von Anthocyanen, die vom Cyanidin abgeleitet sind. Das entsprechende Spektrum der Linie 17 besitzt kein derart ausgeprägtes Maximum. Makroskopisch wurde nur an Keimlingen der Linien 06 und 07 eine lila Färbung beobachtet, nie jedoch bei Linie 17. Zusätzlich traten bei allen Linien Peaks in den Spektren auf bei 315 nm (Zimtsäuren), 420 nm (?) und 655 nm (Chlorophyll).

Die genannten Ergebnisse gelten für Keimlinge unter Dauerlicht-Bedingungen. Wurden die Keimlinge dagegen 10 Tage im Dunkeln angezogen und erst dann belichtet, so konnte der Einfluss des Lichts auf die Synthese der Anthocyane untersucht werden. Abb. 8b zeigt das Ergebnis eines derartigen Versuchs mit Keimlingen der Linien 10 (Genotyp bbe^+e^+) und 17 (Genotyp bbee).
In 10-Keimlingen liegen schon im Dunkeln Anthocyane vom Pelargonidin-Typ vor; durch Belichtung nimmt die Pigmentmenge nicht wesentlich zu. In Keimlingen der Linie 17 sind zu keinem Zeitpunkt Anthocyane nachweisbar, dies steht mit dem ee-Genotyp der Linie in Einklang. Unabhängig davon wurde mit zunehmenden Belichtungszeiten in beiden Linien die "Entstehung" der Peaks bei 420 und 655 nm und eine Erhöhung des Peaks bei 315 nm beobachtet.

3.2.2 Blüten

Aus der Färbung der Petalen (Tab. 1, 2.1.1) ist das Vorliegen oder Fehlen von Anthocyanen ersichtlich.
In Linien mit dem Genotyp $f^+f^+e^+e^+g^+g^+$, also in den Linien 01-10 (11-16 wurden nicht berücksichtigt), erfolgt Anthocyansynthese; in Linien mit dem Genotyp ff (Linie 18), ee (Linie 17) oder gg (Linie 19) ist die Anthocyansynthese unterbrochen und die Petalen sind demzufolge weiss. Bei Linie 18 (ff) kann das Auftreten weisser Petalen auf ein Fehlen von CHS-Enzymaktivität zurückgeführt werden (Spribille und Forkmann, 1981). Diese Linie fand bei den vorliegenden Untersuchungen besondere Beachtung, da bisweilen dennoch zart-violette Petalen beobachtet wurden, was auf die Synthese von Anthocyan schliessen liess. Dies konnte durch die entsprechenden Methanol/HCl-Spektren (2.2) bestätigt werden:

Abb. 9 zeigt die Absorptionsspektren für Petalen der Linien 01-10, 17 und 18 (weisse Petalen). Die Cyanidin-führenden Linien weisen bei 524-530 nm ein Absorptionsmaximum auf, die Pelargonidin-führenden bei 507 nm. Bei den Linien 17 und 18 (weisse Petalen) fehlen diese Peaks vollständig. Abb. 10 demonstriert dagegen eindeutig, dass in violett gefärbten Petalen der Linie 18 ebenfalls ein Peak bei 530 nm nachgewiesen werden kann, der jenem der Cyanidin-führenden Linien entspricht.

3.2.3 Kalluskulturen

In Kalluskulturen der untersuchten Linien, die grundsätzlich die genetischen Voraussetzungen dazu besitzen, konnte die Bildung von Anthocyanen beobachtet werden. Dies waren sowohl die Cyanidin-Linien 01-08, als auch die Pelargonidin-Linien 09 und 10. Die Anthocyansynthese war auf bestimmte Kallusbereiche beschränkt und trat ab Tag 14 ($\pm$ 3 Tage) einer Kulturperiode auf. Sie war besonders stark in Kalluszellen der Linien 07 und 09 und konnte dort durch selektives Subkultivieren der gefärbten Bereiche erheblich verstärkt werden. In Kalluskulturen der Linien 17, 18 und 19 wurde dagegen nie eine Färbung beobachtet.
Die Anthocyanbildung wurde ausschliesslich in Kallusgewebe auf Medium A (2.7.1) beobachtet. Dies enthielt die dafür optimale Hormonzusammensetzung von 10^{-7} M 2,4-D und 10^{-5} M IES (Leweke und Forkmann, 1982). Auf Gamborg-B_5-Medium mit 4,5 x 10^{-6} M 2,4-D (Medium B) traten dagegen nie gefärbte Kalli auf. Ein erhöhter Saccharose-Gehalt (5%, 8%) und/oder ein verminderter Nitrat/Phosphat-Gehalt im Medium A führten zu keiner verstärkten Färbung. Versuche von Leweke und Forkmann (1982), die Anthocyansynthese durch veränderte Licht- und Temperatur-Bedingungen zu steigern, waren fehlgeschlagen.

Grundsätzlich wurde in den anthocyanführenden Kalluskulturen derselbe Pigment-Farbton beobachtet wie in den entsprechenden Petalen. Dies gilt ergänzend zu früheren Beobachtungen von Leber (1977) nicht nur für die Cyanidin-, sondern auch für die Pelargonidin-führenden Linien und konnte durch einen Vergleich der Absorptionsspektren klar belegt werden (Abb. 11).
Es wurden jeweils übereinstimmend in Petalen und in Kallusgewebe Maxima bei 525 nm (Linie 07, Cyanidin-Typ) oder bei 505 nm (Linie 09, Pelargonidin-Typ) gefunden. Dies zeigt, dass die Anthocyane der Kalluszellen - entsprechend den Anthocyanen der Petalen - auf Cyanidin (Linien 01-08) oder auf Pelargonidin (Linien 09 und 10) zurückzuführen sind, und dass somit die Anthocyansynthese in Petalen und Kalli derselben genetischen Kontrolle unterliegt.
Abb. 11 zeigt ausserdem bei den Kallus-Extrakten einen Peak bei 410 nm, der bei Petalen-Extrakten nie gefunden wurde. Er trat unabhängig von der genetischen Konstitution der Linien auf.
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den drei Versuchssystemen (Keimlingen, Blüten und Kalluskulturen) innerhalb einer bestimmten Linie die Anthocyansynthese zwar quantitativ unterschiedlich erfolgt, jedoch in jedem Fall dem (identischen) Genotyp entspricht.(Auf die Besonderheiten von Linie 18 wurde hingewiesen.)
Damit war eine wichtige Voraussetzung erfüllt, diese Systeme aus den erwähnten Gründen (3.1) für die im folgenden beschriebenen Versuche zu verwenden.

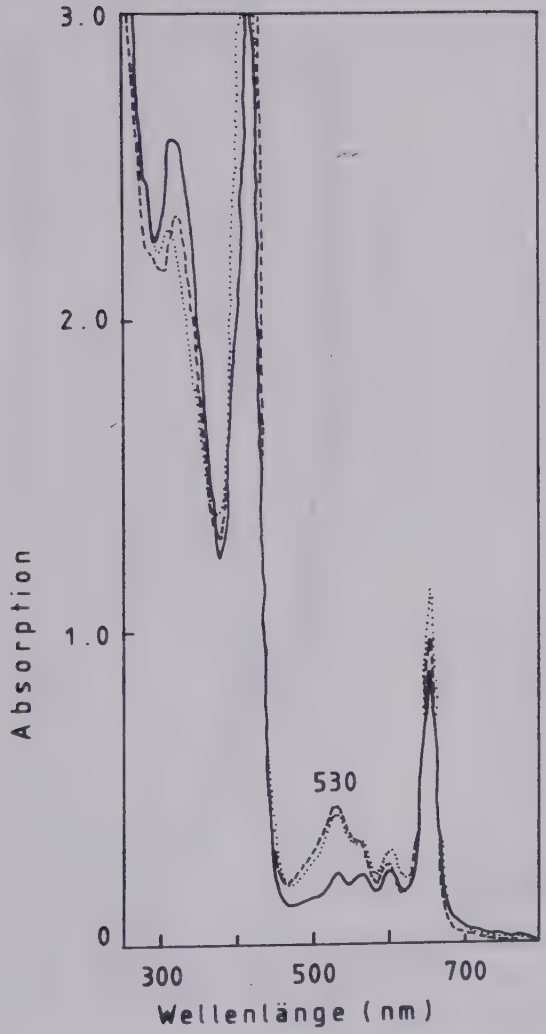


Abb. 8a: MeOH/HCl-Absorptionsspektrum von Extrakten aus Dauerlicht-Keimlingen (9 Tage nach Keimungsbeginn).

---- Linie 06

.... Linie 07

—— Linie 17

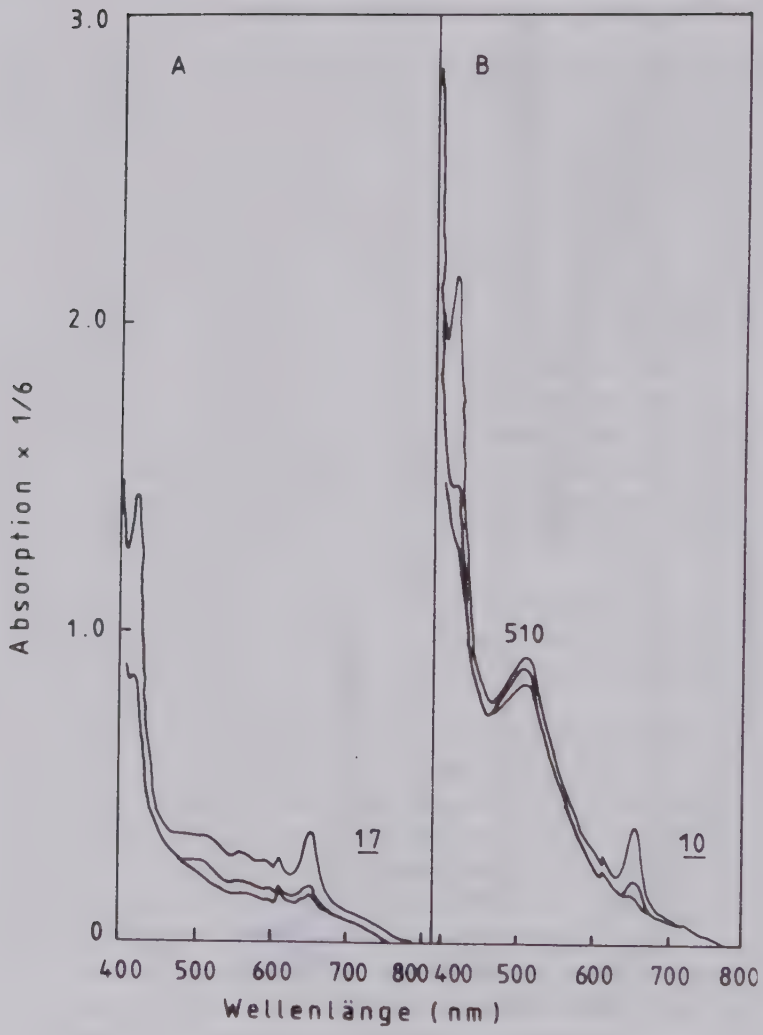


Abb. 8b: MeOH/HCl-Absorptionsspektrum von Extrakten aus etiolierten (10 Tage Dauerdunkel) und dann belichteten Keimlingen, 0 h ("unten"), 3 h und 6 h ("oben") nach Belichtungsbeginn.
A: Linie 17 B: Linie 10

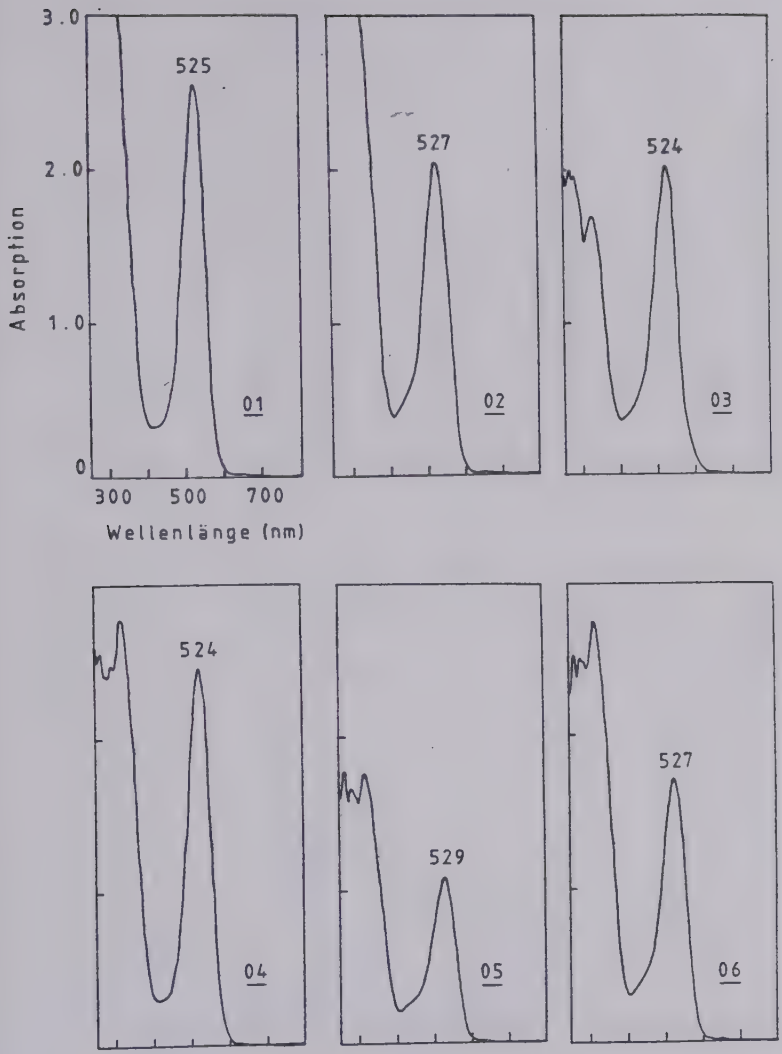
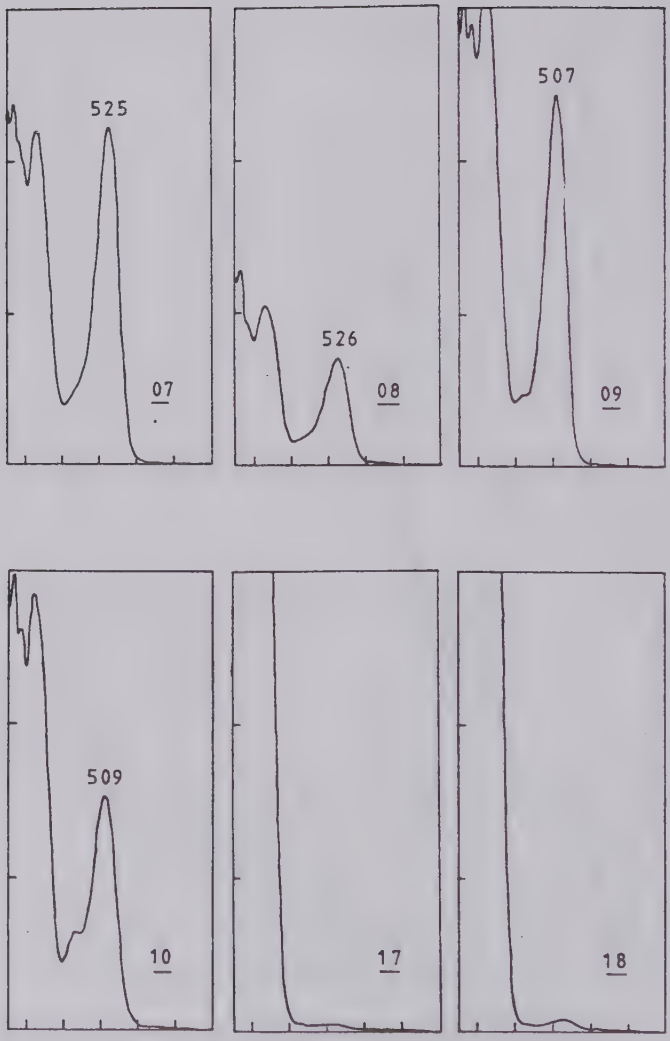


Abb. 9: MeOH/HCl-Absorptionsspektrum von Extrakten aus Petalen der Linien 01-10, 17 und 18 (weiss). Nach Aufarbeitung A (2.2; bei Linie 08 mit nur 0,1 g Frischgewicht) wurden die Extrakte der Linien 01-10 zur Absorptionsmessung 1:10 verdünnt.


525
07
526
08
507
09
509
10
17
18

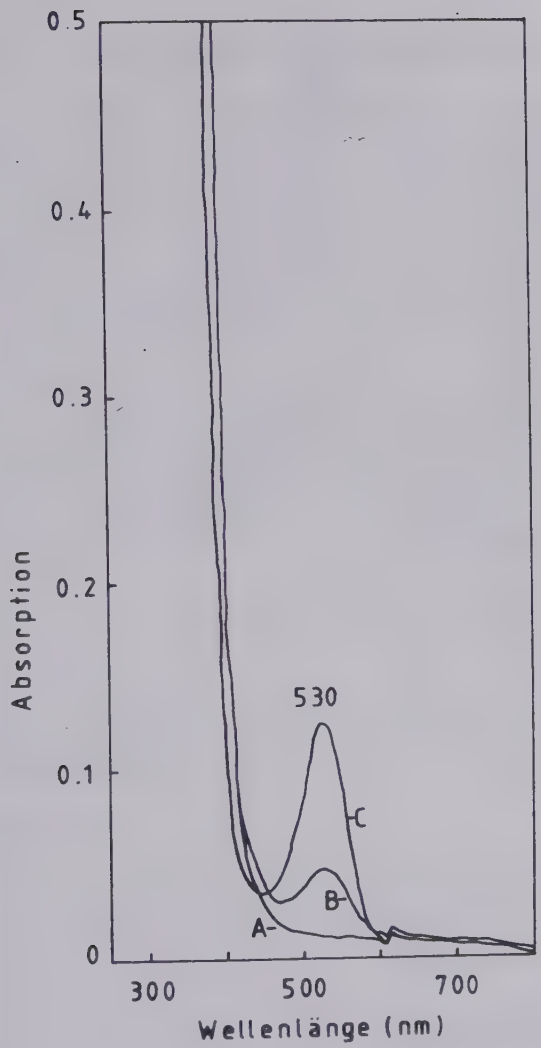


Abb. 10: MeOH/HCl-Absorptionsspektrum von Extrakten aus Petalen der Linien 17 (A), 18 (B: leicht violette Petalen) und 18 (C; stärker violette Petalen) nach Aufarbeitung B (2.2).

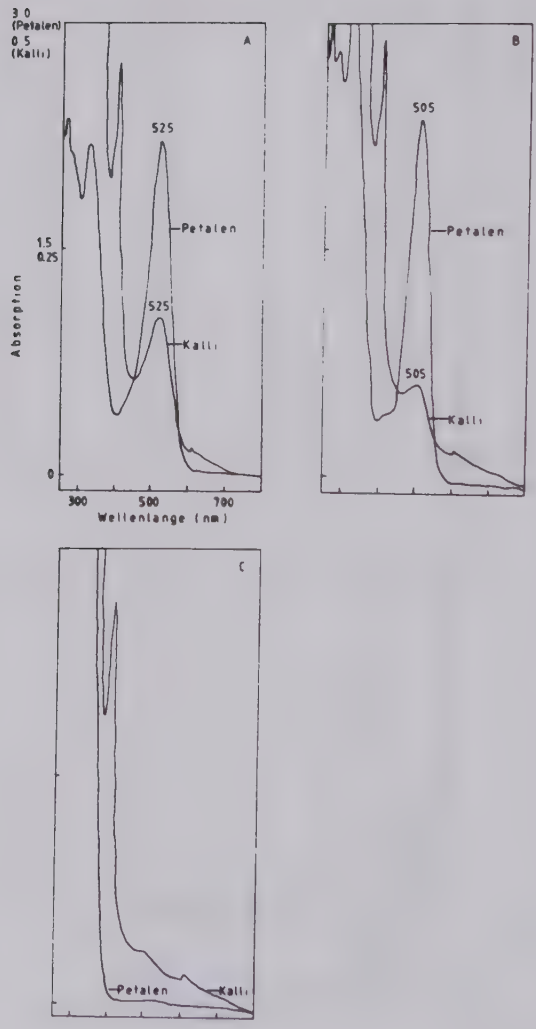


Abb. 11: MeOH/HCl-Absorptionsspektrum von Extrakten aus Petalen (vgl. Abb. 9) und Kalluszellen derselben Linie.
A: Linie 07 B: Linie 09 C: Linie 17

3.3 Die PAL in Matthiola incana

Das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) vermittelt zwischen dem Primär- und dem Sekundärstoffwechsel der Pflanze, indem es einen Teil des über den Shikimatweg angelieferten L-Phenylalanins dem Phenylpropanstoffwechsel zuführt. Durch diese zentrale Bedeutung wird verständlich, warum bei Matthiola incana keine PAL-Mutanten verfügbar sind: PAL-Mutationen sind vermutlich letal.
Die Aktivität der PAL stellt eine Voraussetzung dar für die Synthese von Anthocyanen. Als Enzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels sollte die PAL jedoch auch in weissblühenden Levkojen-Linien nachgewiesen werden können.

3.3.1 Nachweis von PAL-Enzymaktivität

Unabhängig vom Genotyp der einzelnen Linien (s.o.), konnte PAL-Enzymaktivität in den folgenden Systemen nachgewiesen werden:

Keimlinge

In im Licht angezogenen Matthiola-Keimlingen (2.1.3) konnte bei allen untersuchten Linien (06, 07, 10, 17) PAL-Enzymaktivität belegt werden. Grössenordnungsmässig lag die spezifische Enzymaktivität im Rohextrakt (2.3) zwischen 1 und 3 µkat/kg Protein (9 Tage nach Keimungsbeginn). In parallel dazu erstellten Absorptionsspektren der Linien 06, 07 und 17 (Abb. 8a) wird deutlich, dass nur die Linien 06 und 07, nicht jedoch Keimlinge der Linie 17 Anthocyan gebildet hatten.
Für 12 bis 19 Tage im Dunkeln angezogene Keimlinge (Linie 10 und 17) lag die PAL-Aktivität unter 1 µkat/kg Protein.

Blüten

PAL-Aktivität in Matthiola-Petalen wurde durch Untersuchungen von Dangelmayr und Spribille belegt (Zusammenfassung bei Seyffert, 1982).

Kalluskulturen

Wurden Matthiola-Kalli (Linie 06, 17) nach 16 Tagen Dunkelanzucht auf Gamborg-B_5-Medium mit L-Phenylalanin und der Hormonzusammensetzung nach (2.7.1; Medium C) auf PAL-Aktivität getestet, so lag dieser Wert bei 3 µkat/kg Protein. Die PAL-Aktivität dieser Kalluskulturen ist damit ungefähr zehnmal höher als die gleichlang im Dunkeln gehaltener Keimlinge. Kalluszellen der Linie 06 sind im Gegensatz zu 17 -Kalluszellen auf Medium A (2.7.1) unter Dauerlicht-Bedingungen in der Lage, Anthocyan zu synthetisieren (3.2.3).

Damit konnte PAL-Enzymaktivität in Keimlingen und Kalluskulturen eindeutig belegt werden. Ferner wurde für beide Systeme die prinzipielle Unabhängigkeit des Vorkommens der PAL von den Licht/Dunkel-Bedingungen und von der Fähigkeit zur Anthocyansynthese gezeigt.

3.3.2 Induktion von PAL-Enzymaktivität durch Licht

Bei zahlreichen pflanzlichen Objekten wurde gefunden, dass die PAL-Enzymaktivität durch - wenngleich ganz verschiedene - Stimuli beeinflusst werden kann (Hanson und Havir, 1981), wobei Licht in natürlichen Systemen eine wichtige Bedeutung zukommt. Deshalb sollte auch für das Matthiola-Enzym die Frage geklärt werden, ob seine Aktivität durch Licht beeinflusst werden kann. Da sich in diesem Fall Matthiola-Blüten als ungeeignetes Versuchsmaterial erwiesen, wurden die Untersuchungen mit Keimlingen und Kalluskulturen durchgeführt.

3.3.2.1 Keimlinge

Durch PAL-Aktivitätsbestimmungen an im Dunkeln angezogenen und dann belichteten Keimlingen (2.3) konnte gezeigt werden, dass die PAL-Aktivität durch Licht in erheblichem Umfang beeinflussbar ist. Es zeigte sich eine ähnliche Abhängigkeit der spez. PAL-Aktivität im Rohextrakt von der Belichtungszeit der Keimlinge, wie sie für eine Reihe anderer Objekte beschrieben worden war (vgl. 4.2). Abb. 12 zeigt dies für Keimlinge von Linie 10, die 14 Tage im Dunkeln angezogen worden waren. Ca. 6 h nach Belichtungsbeginn wurde, ausgehend von einem niedrigen Dunkel-Wert, nach einem schnellen Anstieg das Maximum der Enzymaktivität (1,8 µkat/kg Protein) erreicht, was einer Steigerung um den Faktor 10 entspricht. Nach einem Tag Belichtung war die PAL-Enzymaktivität wieder auf den ursprünglichen Wert abgefallen. Dieser Reaktionsverlauf stellt somit eine schnelle Antwort der Keimlinge auf Belichtung dar.

Der zeitliche Verlauf der PAL-Aktivität während einer Belichtungsperiode war (innerhalb von Keimlingen einer Linie) stark abhängig vom Alter der Keimlinge (Abb. 13). 12 Tage im Dunkeln angezogene 17-Keimlinge zeigten innerhalb von 6 h einen raschen Anstieg der PAL-Aktivität um den Faktor 7, dann einen langsameren Abfall innerhalb der nächsten drei Tage.

Eine Woche länger im Dunkeln gehaltene Keimlinge zeigten eine davon deutlich verschiedene Reaktion auf Belichtung. Das ausgeprägte anfängliche Maximum bei ca. 6 h trat nicht in vergleichbarem Masse auf, sondern die PAL-Aktivität erhöhte sich in diesem Zeitraum auf ungefähr das Doppelte. Dagegen wurde erst um Tag 6 nach Belichtungsbeginn das Maximum der Enzymaktivität beobachtet.

In "alten" 17-Keimlingen kann die PAL-Enzymaktivität durch Licht demnach nur in verringertem Umfang gesteigert werden (Faktor 4 anstelle Faktor 7) - und diese Steigerung und der anschliessende Abfall dauern um Tage länger. Ein Abfall der PAL-Aktivität auf den ursprünglichen Dunkel-Wert kann bis Tag 12 nicht beobachtet werden; die Keimlinge lassen sich darüberhinaus unter diesen Versuchsbedingungen (2.1.3) nicht länger anziehen.
Jüngere 17-Keimlinge zeigen - verglichen mit den 10-Keimlingen (Abb. 12) - einen ähnlich schnellen Anstieg der Enzymaktivität, jedoch einen verlangsamten Abfall.
Wie unter (3.1) beschrieben, lassen sich Keimlinge verschiedener Linien nur schlecht miteinander vergleichen. In diesem Fall beruht daher der beobachtete Unterschied vermutlich weniger auf Linien-spezifischen Eigenschaften, als auf der Tatsache, dass die verwendeten 17-Keimlinge (12 Tage Dunkel) physiologisch älter sind als die 10-Keimlinge (14 Tage Dunkel). Anscheinend zeigt sich das zunehmende Alter von Matthiola-Keimlingen zunächst in einem verlangsamten Abfall der induzierten PAL-Enzymaktivität und später in einem zusätzlich verzögerten Anstieg.

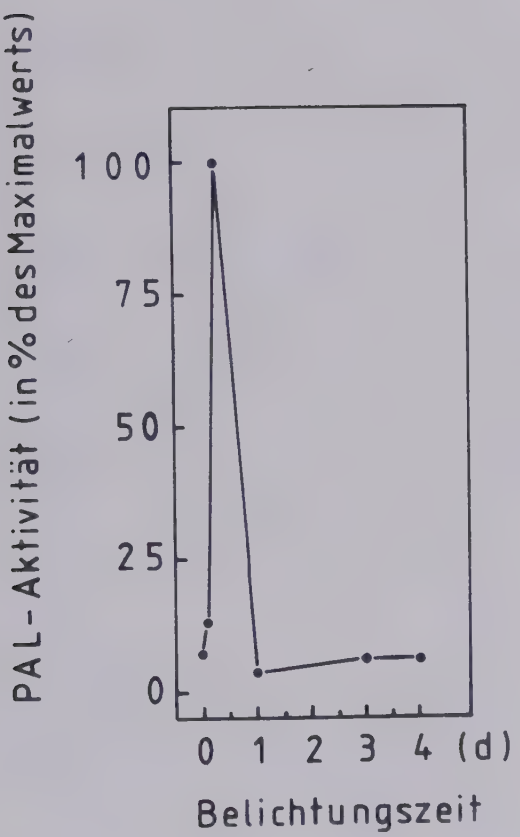


Abb. 12: Licht-induzierte Änderung der PAL-Enzymaktivität in etiolierten 10-Keimlingen (14 Tage Dunkelanzucht). 100% entsprechen 1,8 µkat/kg Protein. Pro Zeitwert wurden zwei Parallel-Rohextrakte hergestellt und nach dem Zentrifugationsschritt vereinigt. Dieser Extrakt wurde 3x parallel auf PAL-Enzymaktivität getestet und der Mittelwert angegeben.

Abb. 13: Licht-induzierte Änderung der PAL-Enzymaktivität in etiolierten 17-Keimlingen nach
12 Tagen Dunkelanzucht (100% = 2,0 µkat/kg Protein)
• —— •
oder
19 Tagen Dunkelanzucht (100% = 2,8 µkat/kg Protein)
▼----▼

Pro Zeitwert wurden drei Parallelextrakte hergestellt und jeweils auf PAL-Enzymaktivität getestet. Der Mittelwert aus den beiden höchsten Aktivitäten ist angegeben.

3.3.2.2 Kalluskulturen

Auch in Matthiola-Kallusgewebe konnte die Induktion von PAL-Enzymaktivität durch Licht nachgewiesen werden. Die Kalli erwiesen sich für Induktionsversuche sehr geeignet, da in den nach (2.3.1) angezogenen Zellen zehnmal so hohe Enzymaktivitäten gefunden wurden wie in Keimlingen.
Zum Nachweis der PAL-Induktion wurden die Kalluskulturen 16 Tage im Dunkeln angezogen. Abb. 14 zeigt den zeitlichen Verlauf der PAL-Aktivität nach Belichtungsbeginn für Kalli der Linien 06, 10 und 17. Die Enzymaktivität wurde durch Belichtung um den Faktor 8-10 (06, 17) bzw. 2,5 (10) gesteigert, die Maximalwerte lagen zwischen 22 und 32 µkat/kg Protein.
06- und 10-Kalli zeigen bei ca. 6 h ein ausgeprägtes Maximum mit einem schnellen Abfall innerhalb der nächsten vier Stunden. Dieses Ergebnis ähnelt stark dem in Abb. 12 dargestellten für Keimlinge der Linie 10. Bei 17-Kalluszellen wird dagegen ein deutlich späteres Maximum bei ca. 10 h beobachtet und überraschenderweise kein nennenswerter Abfall innerhalb der nächsten zweieinhalb Tage.

Eine mögliche Erklärung für das Verhalten der 17-Kalli ist, dass sich die 17-Zellen in einem physiologisch anderen Zustand befinden, wenn nach 16 Tagen Dunkel belichtet wird, und dass darum eine andersartige Reaktion auf die Belichtung stattfindet (vgl. die Ergebnisse für Keimlinge). Möglicherweise stellt das geschilderte Phänomen aber auch einen besonderen Regulationsschritt in Kalli der Linie 17 dar. Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass Pflanzen der Linie 17 weisse Petalen ausbilden, da Linie 17 (ee) eine Unterbrechung der Anthocyanbiosynthese aufweist. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten konnte jedoch aufgrund der vorliegenden Daten nicht unterschieden werden.

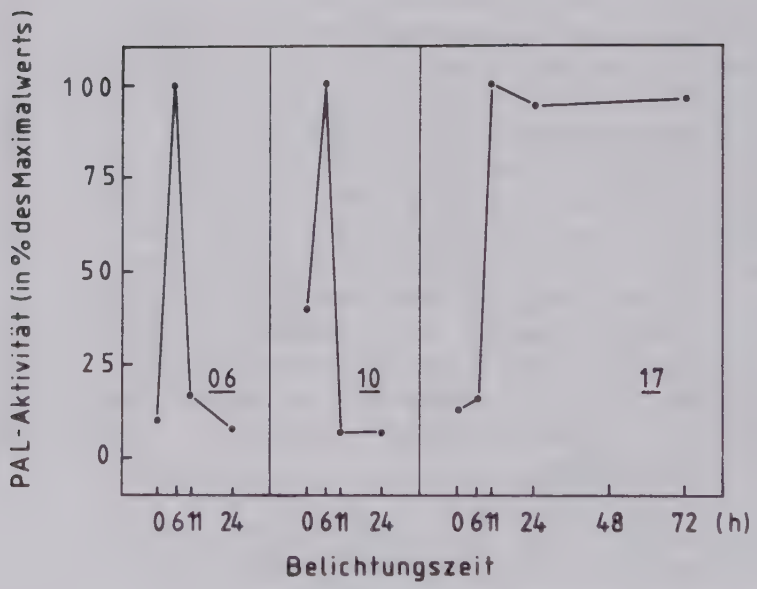


Abb. 14: Licht-induzierte Änderung der PAL-Enzymaktivität in Kalluskulturen der Linien 06, 10 und 17 nach 16 Tagen Dunkelanzucht. 100% entsprechen 32 (Linie 06), 22 (Linie 10) bzw. 25 (Linie 17) µkat/kg Protein.

Damit konnte sowohl in Keimlingen als auch in Kalluskulturen von Matthiola incana die Induzierbarkeit von PAL-Enzymaktivität durch Licht gezeigt werden. Der prinzipielle Verlauf der Enzymaktivität nach Lichtbeginn war in den beiden untersuchten Systemen sehr ähnlich: Die Enzymaktivität erreichte nach ca. 6 h ihr Maximum und fiel innerhalb des gleichen Tages wieder auf ungefähr den Ausgangswert ab. In beiden Systemen wurde eine Steigerung bis um den Faktor 10 gefunden, wenngleich die Absolutwerte in Kalluszellen zehnmal höher lagen. Dieser "typische" Verlauf der PAL-Aktivität wird stark beeinflusst durch den physiologischen Zustand des Untersuchungsmaterials, wie für Keimlinge gezeigt wurde. Auch für Kalluszellen muss diese Möglichkeit erwogen werden, da auch hier z.B. im Wachstumsverhalten zwischen den einzelnen Linien Unterschiede auftreten können.
Die beschriebene Lichtinduktion der PAL-Enzymaktivität konnte in beiden Systemen nicht nur für die "farbigen" Linien, sondern auch für die "weisse" Linie 17 gezeigt werden - sie ist demnach nicht abhängig vom Genotyp der Linie und ihrer Fähigkeit zur Anthocyansynthese. Allerdings zeigten Kalluszellen der Linie 17, wie oben beschrieben, ein vom typischen Induktionsverlauf abweichendes Verhalten.

3.3.3 Nachweis von PAL-Enzymprotein

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse, die auf der Messung von PAL-Enzymaktivitäten beruhen, sind nur denkbar durch das Vorliegen der entsprechenden PAL-Enzymproteine. Für einen Nachweis und die Charakterisierung dieser PAL-Proteine wurden Petalen und lichtinduzierte Kalluskulturen ausgewählt, da sie höhere PAL-Aktivitätswerte aufweisen als Keimlinge.

Das Auffinden von PAL-Enzymprotein war möglich mit Hilfe von SDS-PAGE und Protein-Blotting, eines Antiserums gegen gereinigte PAL aus Petersilie (2.8.1) und der PAP-Methode. Das Vorgehen entsprach dem unter (2.5) beschriebenen für die CHS (Aufarbeitung 1), es wurden jedoch 7,5%ige Gele verwendet. Die Nitrocellulosefilter mit den transferierten Proteinen wurden in PAL-Antiserum geschüttelt und wie üblich weiterbehandelt. Nach der Farbreaktion wurden im allgemeinen mehrere und unterschiedlich starke Banden pro Spur beobachtet. Darum wurden die auftretenden Banden in zwei Molekulargewichts-Bereiche aufgeteilt:

- Bereich A: MG zwischen 78 000 und 82 000
- Bereich B: MG zwischen 67 000 und 75 000

Mit der beschriebenen Methode konnte PAL-Enzymprotein unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität in Matthiola-Petalen und -Kalluskulturen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 15 und 16). Die erhaltenen Daten konnten dabei wie folgt gegliedert werden:

Bereich A

- Bei allen untersuchten Linien (Petalen der Linien 01, 04, 07, 09, 17, 18) wurde eine Bande im Bereich A gefunden. Bei der ebenfalls untersuchten Linie 05 trat im Bereich A keine Bande auf, vermutlich aufgrund einer insgesamt sehr schwachen Färbung.
  Je einmal bei Linie 07 und Linie 09 wurde zusätzlich eine kleinere und schwächere Bande beobachtet.
- Die Häufigkeit, mit welcher Banden im Bereich A auftraten, war unterschiedlich:

  Wildtyp-Linien (01, 04, 05, 07, 09)
  In 6 von 7 Versuchen wurde (mindestens) eine Bande beobachtet, das MG der obersten Bande entspricht (gemittelt) 82 000.

  Linie 17
  In einem von drei Fällen wurde eine schwache Bande bei 82 000 gefunden.

Linie 18
In 2 von 3 Versuchen trat eine Bande bei 79 000 auf. (Dieser Wert liegt aufgrund von Randeffekten im Gel etwas niedrig).

Bereich B

- Im Bereich B traten pro Rohextrakt bis zu drei Banden auf; beim Auftreten mehrerer Banden war eine stets stärker als die anderen.
- Das durchschnittliche MG dieser (einzigen oder jeweils stärksten) Bande entspricht 72 500 (gemittelt aus 9 Versuchen).

Der Nachweis von PAL-Enzymprotein in Matthiola-Kalluskulturen wurde mit Linie 10 geführt. Das Kallusgewebe war freundlicherweise von Frau E. Kraft zur Verfügung gestellt worden. Nach der Dunkelanzucht waren die Kalluszellen 6 h mit Licht induziert worden (2.3.1). Im Bereich A trat keine Bande auf, dagegen im Bereich B eine (einzige) Bande bei einem MG von 73 500.

Aufgrund dieser Daten lassen sich die folgenden Hypothesen aufstellen (unter der Annahme, dass ein intaktes PAL-Enzym aus vier identischen Untereinheiten besteht (Hanson und Havir, 1981)):

Annahme 1

a) Die oberste Bande im Bereich A stellt die funktionsfähige Untereinheit der PAL dar (MG 82 000).
b) Die B-Banden stellen immunologisch nachweisbare Abbauprodukte dar, wobei eines besonders häufig und in grosser Menge auftritt (MG 72 500).

Annahme 2

a) Die oberste Bande im Bereich A stellt einen grossen Precursor für eine kleinere PAL-Untereinheit dar.
b) Die prominente B-Bande (MG 72 500) stellt die "endgültige" PAL-Untereinheit dar.

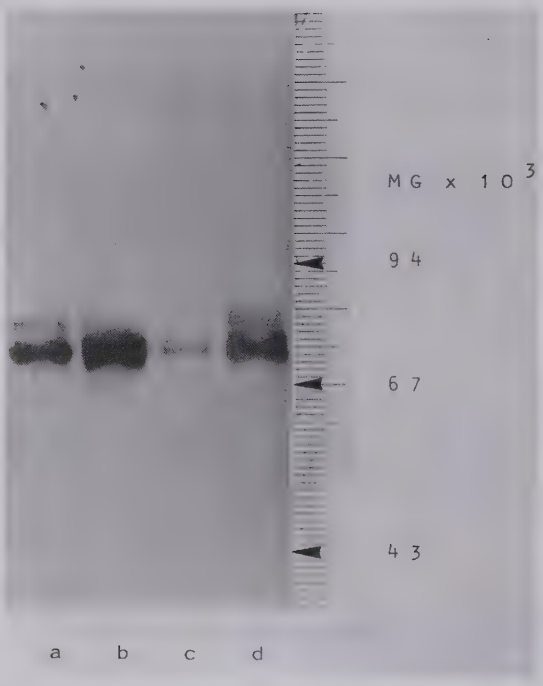


Abb. 15: Nachweis von PAL-Enzymprotein in Petalen und Kalluszellen nach SDS-PAGE (7,5% PA-Gel; 100-200 µg Gesamtprotein/Spur; 30 min 70 V, 16 h 40 V), Protein-Blotting und PAP-Färbung. Gezeigt ist ein Nitrocellulosefilter nach der Farbreaktion (vgl. auch Abb. 16).

a Linie 18, Petalen
b Linie 17, Petalen
c Linie 10, lichtinduzierte Kalluszellen
d Linie 07, Petalen

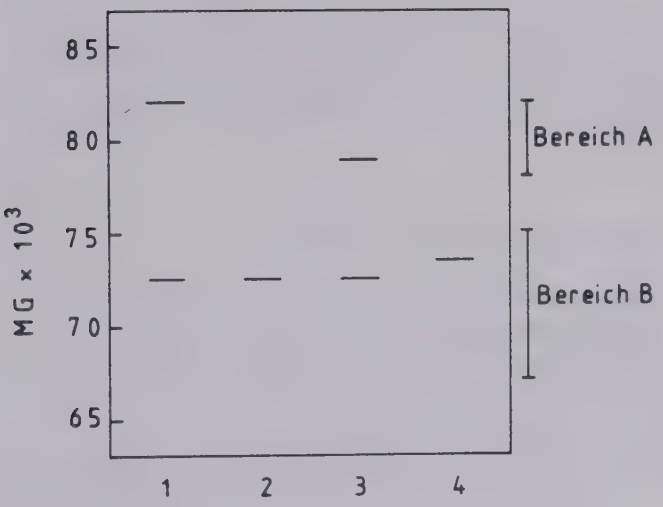


Abb. 16: Schematische Darstellung typischer Versuchsergebnisse zum Nachweis von PAL-Enzymprotein. Eingezeichnet ist das aus allen Versuchen gemittelte Molekulargewicht der PAL-Bande (vgl. Abb. 15) im Bereich A bzw. B. Die Intensität der Banden zueinander wurde nicht berücksichtigt.

1 Petalen, farbigblühende Linien
2 Petalen, Linie 17
3 Petalen, Linie 18
4 lichtinduzierte Kalluszellen, Linie 10

Annahme 3
Die oberste A-Bande (MG 82 000) und die prominente B-Bande (MG 72 500) stellen zweierlei funktionsfähige PAL-Untereinheiten dar, die zu der Entstehung von zwei PAL-"Iso"enzymen führen.

Diese drei, sich aufgrund der beschriebenen Ergebnisse ergebenden Möglichkeiten werden unter (4.2) diskutiert. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass PAL-Enzymprotein aus Petalen und Kalluskulturen durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion zweifelsfrei nachgewiesen werden kann und dass dieser Nachweis unabhängig vom Genotyp der Linie positiv ist.

3.4 Die CHS in Matthiola incana

Die Chalkonsynthase (CHS) stellt das Schlüsselenzym der eigentlichen Flavonoid-Biosynthese dar und wurde als "Flavanon-Synthase" erstmals in Petersilie-Zellkulturen (Kreuzaler und Hahlbrock, 1972) nachgewiesen. Das Vorliegen enzymatisch aktiver CHS stellt aller Wahrscheinlichkeit nach eine notwendige Voraussetzung dar für die Fähigkeit einer Pflanze, Anthocyane synthetisieren zu können. Bei Matthiola incana hatten chemogenetische Untersuchungen (Forkmann, 1977) und Supplementationsversuche (Zusammenfassung bei Seyffert, 1982) darauf hingedeutet, dass Gen f die Entstehung des Flavonoid-Grundgerüsts kontrolliert. Spribille und Forkmann (1981) zeigten die Verbindung zwischen Gen f und der CHS-Enzymaktivität auf: Während in Linien mit rezessiven Allelen an den Loci e oder g CHS-Enzymaktivität gefunden wurde, konnte in Petalen der Linie 18 (ff) keine CHS-Enzymaktivität festgestellt werden (vgl. 2.1.1). Damit kann erklärt werden, warum Linie 18 normalerweise weissblühend ist.

Wie unter (3.2.2) gezeigt, wurde bei Pflanzen von Linie 18 dennoch bisweilen die Ausbildung zart-violetter Petalen beobachtet, und in manchen Wochen im Sommer 1982 konnten im Freiland nur mit Mühe rein weisse 18-Blüten gefunden werden. Dies lies den Verdacht aufkommen, dass Linie 18 dennoch über CHS verfügen könnte.

Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen erschien es notwendig, das Vorhandensein von CHS-Enzymaktivität und von CHS-Enzymprotein unabhängig voneinander in Matthiola nachzuweisen. Diese Versuche wurden unter Berücksichtigung des jeweiligen Genotyps der Pflanzen sowohl an Wildtyp-Linien als auch an weissblühenden Linien mit unterschiedlich lokalisierten Unterbrechungen der Anthocyanbiosynthese durchgeführt. Dabei wurde Linie 18 besondere Beachtung geschenkt. Da in Keimlingen und Kalluskulturen extrem niedrige CHS-Enzymaktivitäten gefunden wurden, wurden die Untersuchungen hauptsächlich mit Petalen durchgeführt. Grundlage für einen Teil der folgenden Versuche war die Bestimmung der CHS-Enzymaktivität in Petalen (2.4). Sie wurde ausnahmslos "direkt", durch Ausschütteln der Reaktionsprodukte mit Äthylacetat bestimmt. Dabei wurden möglicherweise auch Nebenprodukte (Spribille, 1982) der CHS-Reaktion erfasst.
Falls nicht anders angegeben, wurden bei Versuchen mit Linie 18 weisse Petalen verwendet.

3.4.1 Vorversuche zur Bestimmung der CHS-Enzymaktivität in Petalen

Die CHS-Enzymaktivität wurde in Petalen einer Wildtyp-Linie (Linie 07) und in Petalen der Linie 18 bestimmt.

3.4.1.1 Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Wie aus Versuchen von Spribille (1982) bekannt war, ist die bestimmbare CHS-Enzymaktivität stark abhängig von der Matthiola-Proteinkonzentration im Testansatz. Abb. 17 zeigt die Abhängigkeit der CHS-Aktivität (in cpm/kg Protein) unter den hier gewählten Bedingungen (2.4.2) vom Verdünnungsgrad des Rohextrakts im Testansatz. Mit Petalen der Linie 07 wurde eine maximale Aktivität ($1{,}4 \times 10^{12}$ cpm/kg Protein) bei einer Proteinkonzentration von 8 µg/90 µl und die geringste Aktivität ($1{,}8 \times 10^{11}$ cpm/kg Protein) bei einer Proteinkonzentration von 38 µg/90 µl beobachtet, also ein Unterschied bis um den Faktor 10.

3.4.1.2 Quench durch BSA

Um auszuschliessen, dass hohe Proteinkonzentrationen (z.B. durch den Zusatz von Antiserum) im Testansatz (2.4.2, 2.4.3) die Zählausbeute beeinflussen, wurden einer Zählprobe (25 µl einer Äthylacetatphase eines 07-Testansatzes) 0, 320, 960 oder 1920 µg BSA (aus einer Stammlösung von 64 mg/ml) zugesetzt und die Proben in jeweils 4 ml Unisolve gemessen. Die Abweichung der Proben betrug maximal 6% vom höchsten Wert (Abb. 18). Damit konnte der Quench-Effekt auch sehr hoher Proteinmengen in einem Testansatz vernachlässigt werden.

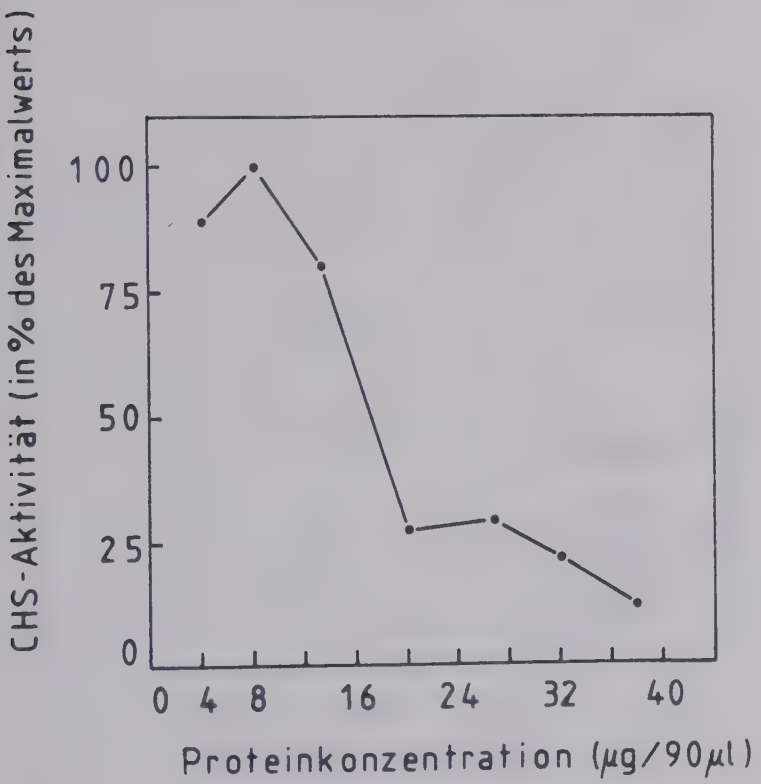


Abb. 17: Abhängigkeit der CHS-Enzymaktivität (in cpm/kg Protein) von der Matthiola-Protein-Konzentration im Testansatz (Petalen, Linie 07). 100% entsprechen 1,4 x 10^{12} cpm/kg Protein.

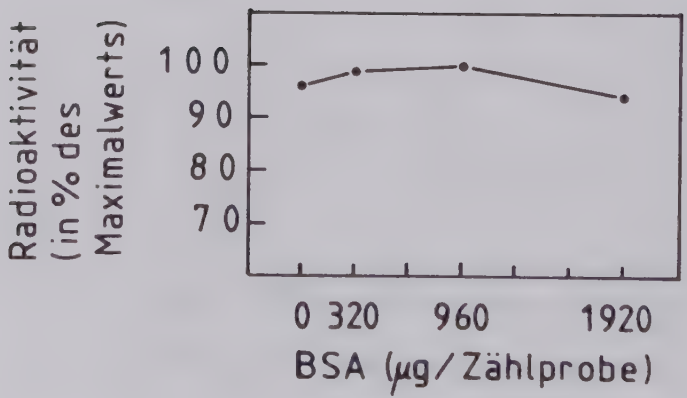


Abb. 18: Beeinflussung der Zählausbeute bei der CHS-Enzymaktivitätsbestimmung durch hohe Proteinkonzentrationen.

3.4.1.3 CHS-Enzymaktivität in Petalen

Wurde die CHS-Enzymaktivität sofort nach der Aufarbeitung oder 5-6 h später (Bedingungen s. 2.4.3) nach (2.4.2) bestimmt, so ergaben sich folgende Werte:

Tab. 2: CHS-Enzymaktivität in Petalen

Petalen der Linie	Bestimmung der Enzymaktivität	Enzymaktivität (cpm/kg Protein)
07	sofort	$1\text{-}4 \times 10^{11}$
	5-6 h später	$7 \times 10^{10} - 3 \times 10^{11}$
18	sofort	$1\text{-}2 \times 10^{10}$
	5-6 h später	2×10^{10}

Damit sank die CHS-Enzymaktivität in 07-Rohextrakten in 5-6 h auf ca. 60% der sofortbestimmbaren Aktivität. Bei Linie 18 konnte dagegen keine Abnahme der Radioaktivität festgestellt werden. Deshalb wurde festgelegt, dass Werte unter 5×10^{10} cpm/kg Protein bedeuten, dass keine CHS-Enzymaktivität feststellbar ist. In Petalen von Linie 18 konnte somit unter den gewählten Bedingungen keine CHS-Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dies entspricht Angaben von Spribille (1982), wonach durch Dünnschichtchromatographie der CHS-Reaktionsprodukte bei 18-Petalen kein Naringenin nachgewiesen werden kann, sondern nur das bislang nicht identifizierte Nebenprodukt I.

Somit bestätigte sich auch hier die genetische Kontrolle der CHS-Enzymaktivität durch den Locus f.

3.4.2 Immunpräzipitation der CHS

Die Spezifität einer gemessenen Enzymreaktion kann durch kompetitive Hemmung mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden. Die in Kap. (3.4.1.3) gemachten Aussagen, die CHS-Enzymaktivität in einer CHS-Wildtyp-Linie (Linie 07; f^+f^+) und in einer CHS-Mutanten-Linie (Linie 18; ff) betreffend, wurden auf diese Art geprüft. Dazu stand ein Antiserum gegen Petroselinum-CHS (2.8.1) zur Verfügung.

Wie unter (2.4.3) beschrieben, wurden Petalen-Rohextrakte (aus Petalen der Linie 07 und 18, Stadium III-IV) und CHS-Antiserum gemischt, nach 5-6 h die Immunpräzipitate abzentrifugiert und der Oberstand auf die verbliebene CHS-Enzymaktivität getestet. Wurde in diesen Rohextrakten im Vergleich zu Rohextrakten ohne Antiserum eine spezifische (s.u.) Abnahme der Radioaktivität in der Äthylacetatphase des Testansatzes festgestellt, so wurde dies als ein Beweis für die Aussagekraft der Messungen und damit als Beweis für CHS-Enzymaktivität gewertet. In Abb. 19 ist das Ergebnis eines Vorversuches dargestellt, der zeigen sollte, dass der gegen die CHS aus Petersilie gerichtete Antikörper in der Lage ist, CHS aus Matthiola-Petalen effektiv zu präzipitieren. Man beobachtet eine strikte Abhängigkeit der "Rest"-Radioaktivität von der eingesetzten Menge an Antiserum: Die in der Äthylacetat-Phase noch messbare Radioaktivität ist umso geringer, je mehr Antiserum dem Testansatz zugefügt worden ist. Dieser Versuch wurde mit Petalen der Linie 07 durchgeführt.

Durch Parallelansätze, in denen das CHS-Antiserum durch unspezifisches Kaninchenserum (eingestellt auf denselben Proteingehalt) ersetzt wurde, konnte unterschieden werden, ob die beobachtete Abnahme der Radioaktivität aufgrund einer spezifischen Interaktion zwischen der CHS und steigenden Mengen an CHS-Antikörper erfolgte oder durch unspezifische Kaninchenserum-Komponenten im Testansatz hervorgerufen sein konnte. Ein Quench-Effekt durch hohe Proteinkonzentrationen konnte ausgeschlossen werden (3.4.1.2). Abb. 20 zeigt dies für Linie 07 im Bereich von 0-5 µl Antiserum bzw. unspezifisches Serum. In den Abbildungen 21 und 22 sind die Ergebnisse aus jeweils drei Versuchen mit den Linien 07 und 18 zusammengefasst. Es zeigten sich wesentliche Unterschiede zwischen den beiden Linien:

3.4.2.1 Linie 07

Um einen deutlichen Abfall der Radioaktivität hervorzurufen, genügten bereits kleine Mengen an Antiserum: 0,1 µl Antiserum führten zu einer 50%igen Abnahme der Radioaktivität (ohne Antiserum: 2×10^{11} cpm/kg Protein). Demnach reichten 0,1 µl Antiserum aus, um ca. 50% aller aktiven CHS-Enzymmoleküle zu präzipitieren. Mengen ab 1 µl Antiserum führten zu einer Rest-Radioaktivität von unter 20% der Kontrolle, was Werten unter 5×10^{10} cpm/kg Protein entspricht (vgl. 3.4.1.3). Wie Abb. 21 zeigt, ist der anfängliche, starke Abfall der Radioaktivität nicht durch die Verwendung von unspezifischem Kaninchenserum zu erreichen. Er stellt somit das Ergebnis einer spezifischen Reaktion zwischen CHS-Antikörper und der CHS aus Linie 07 dar.

Im Gegensatz dazu ist ein ab 5 µl Antiserum zu beobachtender weiterer Abfall der bestimmten Radioaktivität nicht mehr Ausdruck eines weiteren Abfallens der Enzymaktivität bzw. einer spezifischen Antikörper-Reaktion, sondern kommt durch den steigenden Zusatz an unspezifischen Kaninchenserum-Komponenten zustande (Ergebnis nicht gezeigt).

3.4.2.2 Linie 18

Auch bei 18-Petalen zeigte sich eine deutliche Verringerung der geringen, unter 5×10^{10} cpm/kg Protein liegenden Radioaktivität mit zunehmenden Mengen an Antiserum. Es wurden jedoch 5 µl Antiserum benötigt, um eine 50%ige Abnahme der messbaren Radioaktivität zu erreichen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Linien war, dass diese Abnahme der Radioaktivität bei Linie 18 ebenso mit unspezifischem Kaninchenserum erreicht werden konnte (Abb. 22 und 23). Dies stellt eine Bestätigung dar, dass Radioaktivitätswerte unter 5×10^{10} cpm/kg Protein bedeuten, dass keine CHS-Enzymaktivität vorliegt (vgl. 3.4.1.3), da sie durch den Zusatz von CHS-Antiserum nicht spezifisch herabgesetzt werden können. Daraus folgt, dass in Petalen der Linie 18 auch mit der Methode der Immunpräzipitation keine CHS-Enzymaktivität festgestellt werden kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit dem CHS-Antiserum und einem unspezifischen Kontroll-Serum vorhandene Enzymaktivität eindeutig nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden kann.

Die damit gewonnenen Ergebnisse stützen jene aus reinen Radioaktivitätsmessungen und bestätigen erneut die genetische Kontrolle der CHS-Enzymaktivität: In Petalen der Linie 07 kann CHS-Enzymaktivität festgestellt werden, in Petalen der Linie 18 dagegen nicht; der Ausfall der CHS-Enzymaktivität bei Linie 18 ist korreliert mit dem Vorliegen rezessiver Allele am Locus f.

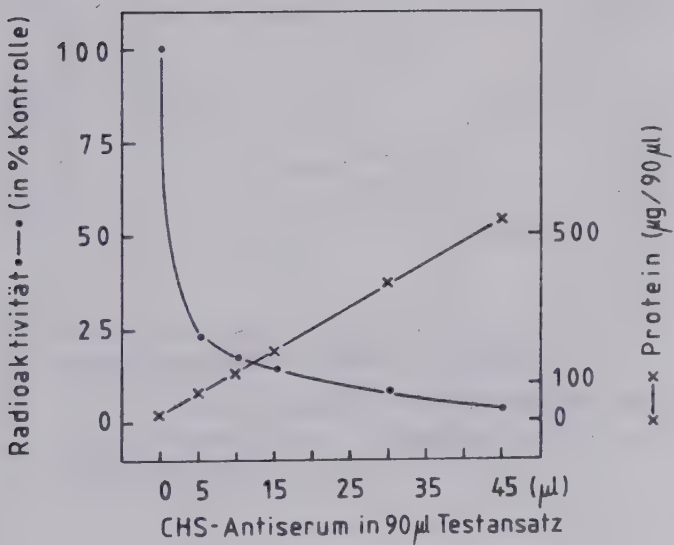


Abb. 19: Beeinflussung der CHS-Enzymaktivität in Petalen-Rohextrakten (Linie 07) durch Präzipitation der CHS mit CHS-Antiserum, gezeigt an der noch messbaren Radioaktivität in der Äthylacetat-Phase des Testansatzes. 100% entsprechen 2,1 x 10^{11} cpm/kg Protein (= Kontrollwert ohne Antiserum).

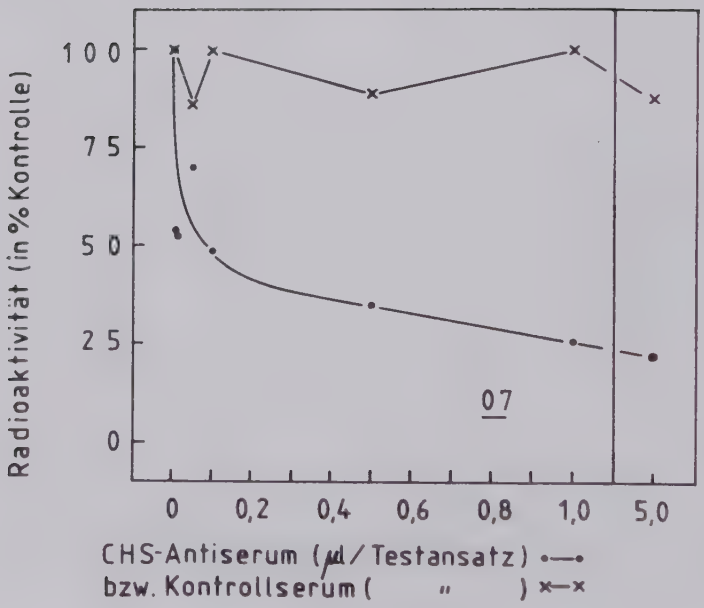


Abb. 20: Nachweis für die spezifische Abnahme der Radioaktivität (vgl. Abb. 19) durch Immunpräzipitation der CHS. 100% entsprechen 2,0 x 10^{11} cpm/kg Protein (= Kontrollwert ohne Antiserum). Die Werte für das unspezifische Kontrollserum wurden aus drei Versuchen ermittelt (vgl. Abb. 21); 100% entsprechen 2,2 x 10^{11} cpm/kg Protein.

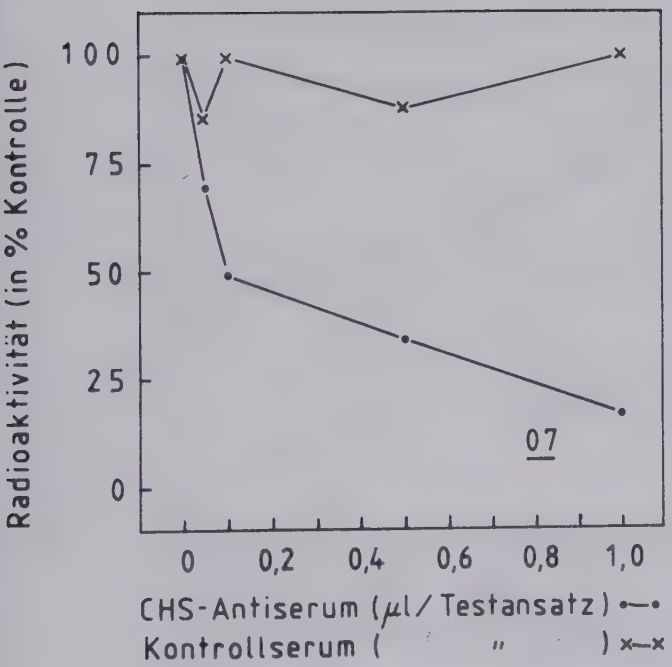


Abb. 21: Zusammenfassung aus drei Versuchen, die die spezifische Präzipitation von CHS aus 07-Petalen-Rohextrakten durch CHS-Antiserum demonstrieren.
100 % entsprechen 2,2 x 10^{11} cpm/kg Protein.

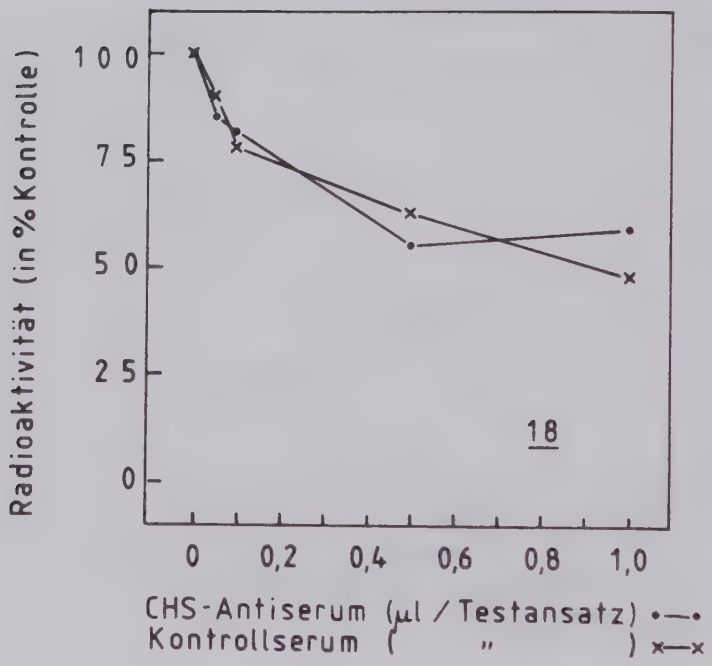


Abb. 22: Zusammenfassung aus drei Versuchen mit 18-Petalen-Rohextrakten (vgl. Abb. 21). 100% entsprechen $3{,}8 \times 10^{10}$ cpm/kg Protein.

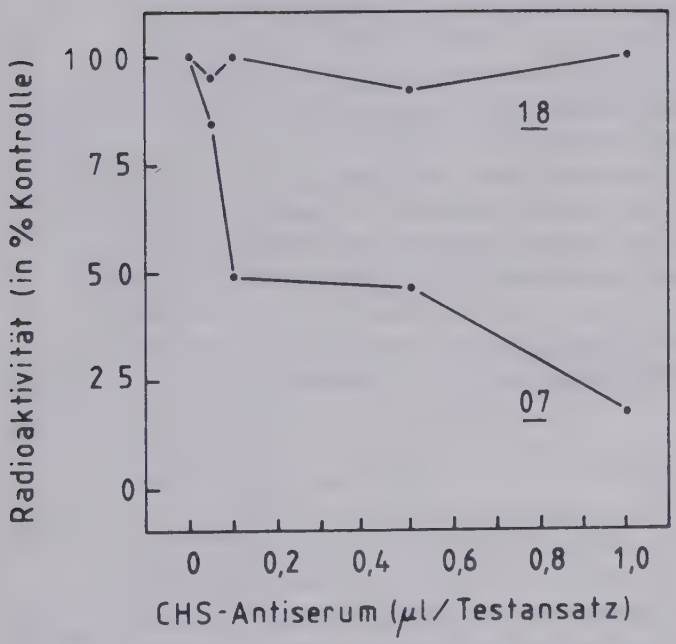


Abb. 23: Der Inhibitionseffekt von CHS-Antiserum - nach Abzug der Wirkung des Kontrollserums - in Petalen-Rohextrakten der Linien 07 und 18, kombiniert aus den Abbildungen 21 und 22. Die Kontrollwerte ohne Serumzusatz liegen bei $2{,}2 \times 10^{11}$ (07) bzw. $3{,}8 \times 10^{10}$ (18) cpm/kg Protein.

3.4.3 Nachweis von CHS-Enzymprotein mit der PAP-Methode

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die CHS als Enzymprotein in Matthiola incana unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität nachzuweisen. Dies war möglich durch den Einsatz eines CHS-Antiserums (2.8.1), dessen Eignung für die Präzipitation von Matthiola unter (3.4.2) gezeigt worden war. Nach SDS-PAGE (2.5.1) und Protein-Blotting (2.5.2) wurden die Immunpräzipitate mit Hilfe der PAP-Methode nachgewiesen (2.5.3).
Bei den im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde das qualitative und quantitative Vorkommen von CHS-Enzymprotein in Abhängigkeit vom Genotyp der betreffenden Linien (3.4.4) und während verschiedener pflanzlicher Entwicklungsstadien (3.4.6) aufgezeigt. Als Versuchssysteme fanden dabei Petalen und Kalluskulturen Verwendung, Keimlinge wurden nicht untersucht.

3.4.3.1 Aufarbeitung von Petalen für die SDS-PAGE

Wurden Matthiola-Petalen der Linien 04, 07, 17, 18 oder 19, wie unter (2.5.1.1) beschrieben, aufgearbeitet und der Gesamt-Proteingehalt der Rohextrakte bestimmt (2.6), so wurden mit Aufarbeitung 1) Proteinkonzentrationen von ca. 4 mg/ml erreicht, mit Aufarbeitung 2) 7 mg/ml und mit Aufarbeitung 3) 13 mg/ml. Je nach Aufarbeitung konnte somit ein 2- bis 3-fach konzentrierter Petalenextrakt hergestellt werden.

Am Beispiel von Linie 07 wurden verschiedene Blüten-Entwicklungsstadien untersucht.

Der Proteingehalt der Rohextrakte (Aufarbeitung1) bezogen auf jeweils 0,25 g Petalen-Frischgewicht, zeigt ein deutliches Maximum bei Stadium 0 (5 mg/ml), also bei jenen Petalen, in welchen kurze Zeit später die Anthocyanbildung sichtbar wird (Abb. 32).

3.4.3.2 Aufarbeitung von Kallusgewebe für die SDS-PAGE

Für den Nachweis von CHS-Enzymprotein in Matthiola-Kalluskulturen standen zwei verschiedene Systeme zur Verfügung (vgl. 2.5.1.2):

a) Anthocyanhaltige 07-Kalluskulturen aus Dauerlicht-Bedingungen (2.1.4).
b) 07-Kalluskulturen, im Dunkeln auf Medium A (2.7.1) angezogen und ab Tag 14 mit Weisslicht belichtet (2.1.4).

Die Proben wurden nach (2.5.1.2) aufgearbeitet, die Rohextrakte nach (2.5.1.3) denaturiert und auf 10% SDS-PA-Gelen aufgetrennt (2.5.1.4).

3.4.3.3 Auftrennung von Petalen-Proteinen auf SDS-PA-Gelen

Wurden Petalen-Rohextrakte (2.5.1.1) auf 10% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und die Gele anschliessend mit Serva Blau G gefärbt (2.5.1.4), so konnten Proteine und Protein-Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von zwischen ca. 20 000 und 94 000 sichtbar gemacht werden. Es wurden neben einer Vielzahl schwacher Banden stets drei dominierende Banden bei 50 000, 39 000 und 26 000 beobachtet (Linie 07, 17 und 18). Zwischen den einzelnen Linien konnte kein deutlicher Unterschied festgestellt werden (Abb. 24).

3.4.3.4 Auftrennung von Kallus-Proteinen auf SDS-PA-Gelen

Das Bandenmuster von aufgetrennten 07-Kallusextrakten zeigte starke Ähnlichkeit zum Petalen-Bandenmuster (Abb. 24). Es fiel jedoch auf, dass im Molekulargewichtsbereich 36 000 bis 42 000 stets zwei starke Banden (ca. 41 000 und 38 000) auftraten. Bei Petalen lag in diesem Bereich immer nur eine starke Bande bei ca. 39 000 vor.

3.4.3.5 Protein-Blotting

Wie unter (2.5.2) beschrieben, konnten die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf Nitrocellulose transferiert werden. Abb. 24 zeigt an einem Beispiel die Effizienz der Methode. Dazu wurden von zwei identischen Gelen das eine sofort in Serva Blau G gefärbt, das andere transferiert und anschliessend gefärbt. Nach 1,5 h Transferdauer ist nur ein Teil der Proteine vollständig auf Nitrocellulose übertragen, nämlich jene Proteine, deren Molekulargewicht kleiner als ca. 34 000 ist. Daher wurde bei Bedarf ein Gel einem zweiten Transfer unterzogen, um eine weitere Nitrocellulose-"Kopie" des betreffenden Gels zu erhalten (vgl. 3.4.5.1). Da kleine Proteine schneller transferiert werden als grosse, kann die Transfer-Effizienz nur zwischen Proteinen ähnlichen Molekulargewichts verglichen werden. Darin wurde stets eine gute Übereinstimmung gefunden.

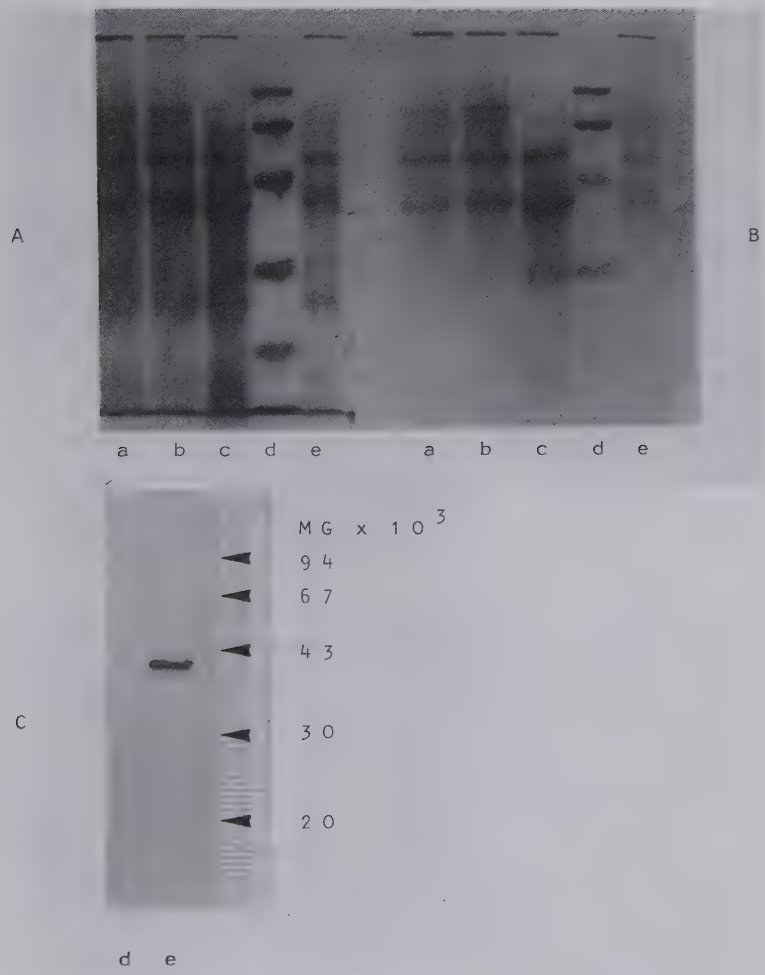


Abb. 24: A Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Matthiola-Proteinen. Gezeigt ist ein 10% SDS-PA-Gel nach Serva Blau G-Färbung; aufgetrennt wurden die Proteine aus
a 18-Petalen b 17-Petalen
c 07-Kalluszellen e 07-Petalen
sowie
d Marker-Proteine.
(Petalen-Aufarbeitung 1, 2.5.1.1; Kalluszellen: Aufarbeitung a, 2.5.1.2; aufgetragen wurden je 100 µl denaturierter Rohextrakt = ca. 300 µg Protein, von 07-Petalen und Marker-Proteinen je 50 µl).

B Identisches Gel nach 1,5 h Transfer, gefärbt mit Serva Blau G.
C Nachweis von CHS-Enzymprotein mittels PAP-Methode in dem 07-Petalen-Rohextrakt. Gezeigt ist das Nitrocellulosefilter nach der Farbreaktion, auf das die Proteine aus Gel B transferiert worden waren (Spur d und e).

3.4.3.6 Spezifität des Nachweises

Mit dem gegen hochgereinigte CHS aus Petersilie gerichteten Antiserum (2.8.1) und der PAP-Methode (2.5.3), konnte CHS-Enzymprotein eindeutig nachgewiesen werden. Auf Nitrocellulosefiltern, die "Kopien" von Gelen mit aufgetrennten Proteinen darstellen, wurde die CHS-Untereinheit als farbige Bande beobachtet (Abb. 24). Der Nachweis ist hochspezifisch, es wurde bei Wildtyp-Linien nur eine Bande gefunden. Daraus konnte gefolgert werden, dass die CHS in Matthiola - bezüglich ihres Molekulargewichts - aus identischen oder sehr ähnlichen Untereinheiten besteht. Die Marker-Proteine (2.5.1.3) zeigten bei der PAP-Färbung keine positive Reaktion.

Abb. 25 zeigt das Ergebnis eines Versuchs mit 07-Petalen zur Feststellung der unteren Nachweisgrenze der PAP-Methode unter den gewählten Bedingungen. Es zeigte sich, dass bei Gesamtprotein-Mengen zwischen 96 µg (unverdünnter Rohextrakt nach Aufarbeitung 1) und 10 µg (1:10-Verdünnung) pro Gelspur, CHS-Untereinheiten nachgewiesen werden konnten. Bei Proteinmengen unter 2 µg (2, 1 und 0,1 µg; Ergebnis nicht gezeigt) pro Gelspur gelang dieser Nachweis nicht mehr. Die Farbintensität und Dicke der CHS-Bande auf dem Nitrocellulosefilter entsprach reproduzierbar der Verdünnungsstufe des Rohextrakts und damit der CHS-Konzentration im Rohextrakt. Dadurch war es möglich, relative Vergleiche der CHS-Proteinkonzentration in unterschiedlichen Petalenextrakten durchzuführen.

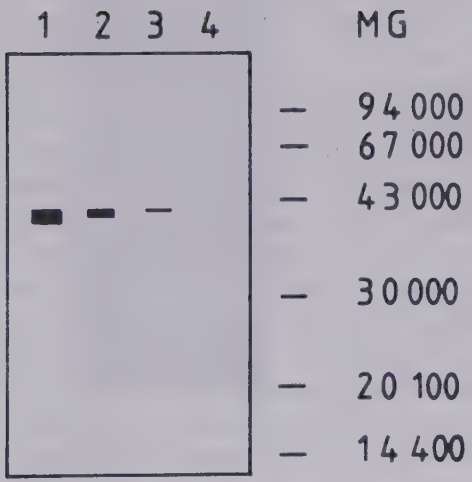


Abb. 25: Nachweis-Empfindlichkeit der PAP-Methode, gezeigt an Verdünnungsstufen eines 07-Petalenextrakts. Dargestellt ist ein Nitrocellulosefilter nach der PAP-Farbreaktion. Pro Geltasche waren 40 µl denaturierter Rohextrakt aufgetragen worden.
1 unverdünnter Extrakt (3 mg Protein/ml)
2 1:5 verdünnter Extrakt
3 1:10 verdünnter Extrakt
4 Marker-Proteine; die Position der Proteine ist rechts angegeben.

3.4.4 CHS-Enzymprotein in genetisch definierten Linien

3.4.4.1 Petalen

Mit der zuvor beschriebenen Methode konnte CHS-Enzymprotein in Petalen (Blütenstadium III-IV, "gefüllte" Blüten) aller untersuchter Linien nachgewiesen werden. Abb. 26 zeigt dies am Beispiel der Linien 07, 08 und 09. Der Nachweis wurde in den Linien 01, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 17, 19 und auch in Linie 18 erfolgreich geführt. Dabei ist sowohl in weissen als auch in zartvioletten Petalen der Linie 18 eindeutig CHS-Enzymprotein vorhanden (Abb. 27).
Damit erwies sich die PAP-Methode als hervorragend geeignet, das Vorliegen von CHS-Enzymprotein in Petalen-Rohextrakten zu zeigen. In den Linien 01 bis 09 war aufgrund ihres f^+f^+-Genotyps CHS-Enzymprotein erwartet worden, dies gilt auch für die weissblühenden Linien 17 und 19. Aufgrund der PAP-Färbungen wurde jedoch deutlich, dass die Linien 17 und 19 weit weniger CHS-Enzymprotein aufweisen als die "farbigen" Linien; das Mengenverhältnis "weiss" zu "farbig" beträgt grob geschätzt 1:30 (bezogen auf Gesamtprotein-Gehalt; vgl. 4.4). Petalen der Linie 18 (Genotyp ff) enthalten wesentlich (3-4 mal) mehr CHS-Enzymprotein als 17- oder 19-Petalen, gleichgültig ob weisse oder violette 18-Petalen untersucht werden. Wie mehrfach betont, konnte jedoch bislang in weissen 18-Petalen keine CHS-Enzymaktivität nachgewiesen werden (3.4.2).
Da die Färbung der violetten 18-Petalen jedoch auf Cyanidinen beruht (3.2.2), muss angenommen werden, dass - zumindest zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Blütenentwicklung (vgl. 3.4.6) - enzymatisch aktive CHS in den Petalen vorliegt.

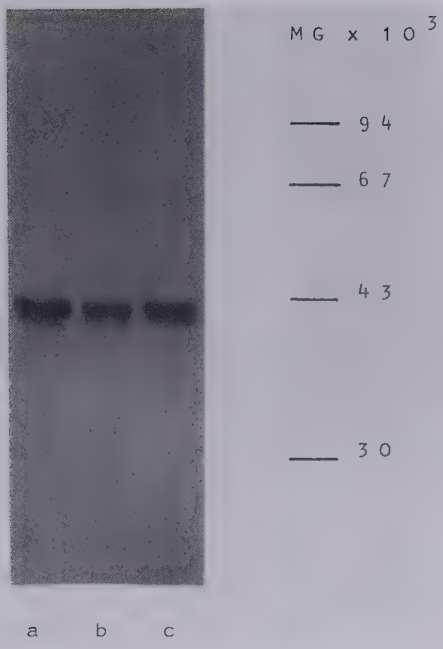


Abb. 26: Nachweis von CHS-Enzymprotein in Petalen der Linien 07 (Spur a), 08 (Spur b) und 09 (Spur c) (Aufarbeitung 1 (2.5.1.1), 100 µl denaturierter Rohextrakt/Gelspur = ca. 300 µg Protein). Gezeigt ist ein Nitrocellulosefilter nach der PAP-Farbreaktion.

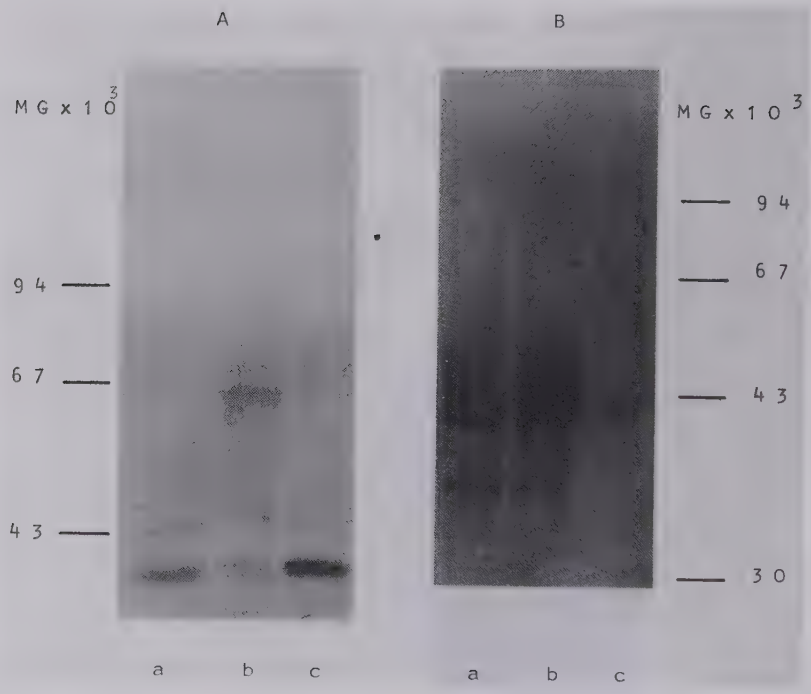


Abb. 27: Nachweis von CHS-Enzymprotein in Petalen weissblühender Linien mit der PAP-Methode. Als Kontrolle wurden 09-Petalen verwendet.

A a Linie 18 (weiss)
b Linie 17
c Linie 09
(Aufarbeitung 1, vgl. Abb. 26)
B a Linie 18 (leicht violett)
b Linie 18 (weiss)
c Linie 17
(Aufarbeitung 3)
(Zu den auftretenden Nebenbanden vgl. 3.4.5.1)

Die erhaltenen Resultate zeigen, dass der Nachweis von CHS-Enzymprotein mit der PAP-Methode prinzipiell unabhängig ist von einer enzymatischen Aktivität des Enzyms. In Tab. 3 sind die Ergebnisse zusammengefasst:

3.4.4.2 Kalluskulturen

Der Nachweis von CHS-Enzymprotein in Matthiola-Kalluskulturen gestaltete sich wesentlich schwieriger als derjenige in Petalen, da mit Hilfe der PAP-Methode keine eindeutige CHS-Bande auf den entsprechenden Nitrocellulosefiltern auftrat. Die Ergebnisse sind im einzelnen unter (3.4.5.2) aufgeführt.

3.4.5 Molekulare Charakterisierung der CHS

Durch die Anwendung der PAP-Methode konnte nicht nur prinzipiell das Vorhandensein von CHS-Enzymprotein in Matthiola-Rohextrakten nachgewiesen, sondern auch das Molekulargewicht der CHS-Untereinheiten bestimmt werden. Da die Nitrocellulosefilter grössengleiche "Kopien" der entsprechenden Gele darstellen, wurde mit Hilfe der Serva Blau G-gefärbten Gel-Markerproteine (2.5.1.3) den CHS-Banden auf den Filtern das entsprechende Molekulargewicht zugeordnet.

3.4.5.1 Petalen

Das Molekulargewicht für die identischen oder sehr grössenähnlichen Untereinheiten der CHS in Matthiola-Petalen kann mit je 41 500 angegeben werden. Dieser Wert wurde aus 42 Bestimmungen mit weissen und farbigen Petalen erhalten.

Tabelle 3: CHS-Enzymprotein in genetisch definierten Matthiola-Linien

Genotyp	Linie(n)	Farbe der Petalen	CHS-Enzymaktivität	CHS-Enzymprotein
$f^+f^+e^+e^+g^+g^+$	01, 04, 05, 06, 07, 08, 09	violett etc.	vorhanden +++	vorhanden +++
$f^+f^+e\ e\ g^+g^+$	17	weiss	vorhanden, verringert auf ca. 25%[2] +	vorhanden, Menge verringert auf ca. 3%[1] +
$f^+f^+e^+e^+g\ g$	19			
$f\ f\ e^+e^+g^+g^+$	18	weiss	fehlt -	vorhanden, Menge verringert auf ca. 10%[1] ++
		violett	? ?	vorhanden, Menge verringert auf ca. 10%[1] ++

1) verglichen mit den "farbigen" Linien 01 bis 09; bezogen auf den Gesamtprotein-Gehalt der Rohextrakte; ermittelt aufgrund der Intensität der PAP-Färbung durch Vergleich mit Verdünnungsstufen eines 04-Rohextraktes.

2) bezogen auf den Gesamtprotein-Gehalt der Rohextrakte (Forkmann, persönliche Mitteilung); ein direkter Vergleich mit der Menge an CHS-Enzymprotein ist aufgrund anderer Versuchsbedingungen nicht möglich.

Das Molekulargewicht der vier identischen CHS-Untereinheiten aus Petroselinum hortense wurde mit je 42 000 bestimmt (Kreuzaler et al., 1979), jenes für die CHS-Untereinheiten aus Phaseolus mit je 42 500 (Lawton et al., 1983). Auch diese Werte waren mit Antiserum gegen Petersilie-CHS ermittelt worden.
Somit konnte gezeigt werden, dass die CHS-Untereinheiten in Matthiola incana unabhängig vom Genotyp der Linie innerhalb der Messgenauigkeit ein Molekulargewicht aufweisen, dass jenem für Untereinheiten aus anderen Pflanzen entspricht.

Nach der Behandlung mit CHS-Antikörper und anschliessender PAP-Färbung, wurde im allgemeinen spezifisch die CHS-Bande auf den Nitrocellulosefiltern sichtbar. Bisweilen wurden jedoch auch - zumeist schwächere - zusätzliche Banden beobachtet, und zwar in den Molekulargewichts-Bereichen 63 000 bis 75 000 (Bereich 1) oder 30 000 bis 35 000 (Bereich 2). Diese Bereiche liessen sich stets gut vom Gebiet der CHS (41 500) unterscheiden.

Bezüglich dieser Nebenbanden ergab sich:

1) Nebenbanden traten ausschliesslich auf bei "weissen" Petalen (Linie 17, 18 weiss, 18 lila, 19), nicht dagegen bei Rohextrakten aus farbigen Petalen.
2) Welche Nebenbanden auftraten, war abhängig von der Aufarbeitung bzw. von der Gesamtprotein-Konzentration der Rohextrakte:
   - Nebenbanden im Bereich 1 traten nur auf nach Aufarbeitung 1 (2.5.1.1).
   - Nebenbanden im Bereich 2 traten ausschliesslich auf nach Aufarbeitung 2 oder 3.
3) Nebenbanden im Bereich 2 traten demnach nur bei höher konzentrierten Rohextrakten aus "weissen" Petalen auf. Sie konnten nicht näher identifiziert werden und stellen möglicherweise CHS-Abbauprodukte dar.
4) Nebenbanden im Bereich 1 traten nur nach Aufarbeitung 1 bei Rohextrakten von Linie 17 und 18 weiss auf, bei Linie 17 waren die Banden stets wesentlich stärker.

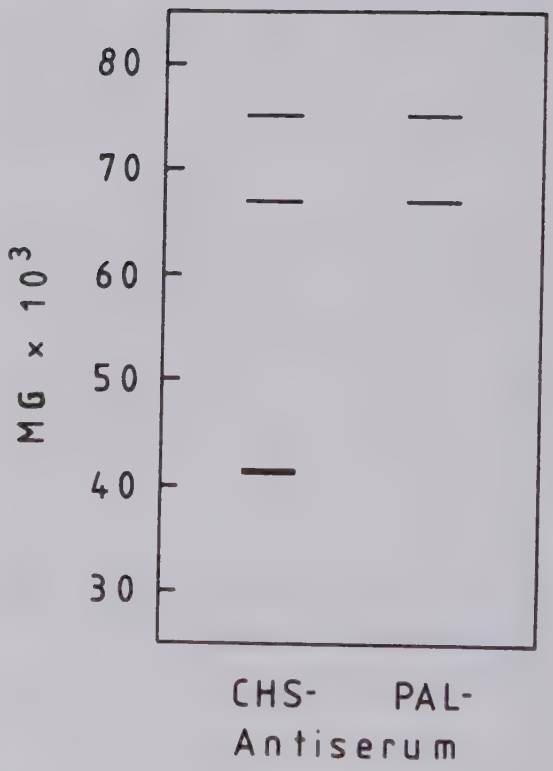


Abb. 28: Identifizierung von Nebenbanden beim CHS-Nachweis in 17-Petalen mittels PAP-Methode. Das erste Nitrocellulosefilter (= die erste Kopie des Gels) wurde mit CHS-Antiserum behandelt (Ergebnis links), das zweite Filter (= die zweite Kopie desselben Gels) in PAL-Antiserum eingelegt (Ergebnis rechts).

Dadurch, dass vom selben Gel eine zweite Nitrocellulose-"Kopie" hergestellt wurde, die mit PAL-Antikörper behandelt und PAP-gefärbt wurde, konnte die Identität dieser Banden mit PAL-Banden gezeigt werden (vgl. Abb. 28).

3.4.5.2 Kalluskulturen

Der Nachweis von CHS-Enzymprotein in Matthiola-Kalluskulturen erwies sich als schwierig. Bei System a) (2.5.1.2) gelang es nicht, eine vorherrschende Bande im Bereich 40 000 bis 42 000 (Molekulargewicht) auf dem Filter nachzuweisen, wie dies für Petalen möglich war. Vielmehr wurde eine Vielzahl schwacher Banden zwischen ca. 15 000 und 80 000 gefunden.
Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass im Augenblick der visuellen Beobachtung einer Anthocyansynthese keine funktionsfähige CHS (mehr) in den Kalluszellen vorliegt, dass aber davor ein Zeitpunkt deutlicher CHS-Anhäufung liegen könnte. Diese Frage sollte mit System b) geklärt werden. Jedoch konnten trotz der extrem konzentrierten Rohextrakte keinerlei Banden beobachtet werden. Dabei gaben parallelbehandelte Kontrollproben mit Petalenextrakten eine eindeutige und positive Reaktion. Wurden vergleichsweise stark anthocyanhaltige Daucus carota-Zellkulturen verwendet (System c)), so ergab sich ein ähnliches Bild. Die Kalluszellen wurden zu einem Zeitpunkt maximaler CHS-Enzymaktivität geerntet (Hinderer, 1982). Nach c1) (2.5.1.2) aufgearbeitet, führte dies zu einer Bande, die der Front im Gel entsprach. Wurde eine konzentriertere Aufarbeitung (c2)) durchgeführt, so wurde eine Vielzahl schwacher Banden sichtbar (Molekulargewicht zwischen ca. 30 000 und 90 000). Die Frontbande trat relativ stark in Erscheinung (Abb. 29).

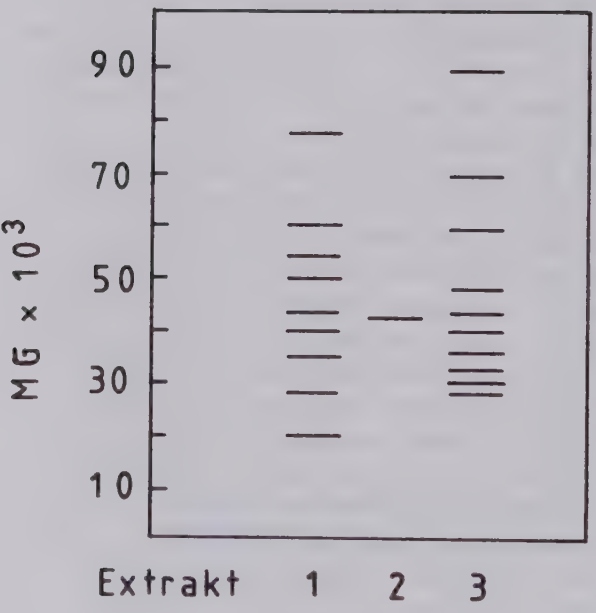


Abb. 29: "Nachweis" von CHS-Enzymprotein in Kalluskulturen. Gezeichnet ist ein Nitrocellulosefilter nach der PAP-Farbreaktion. Die Rohextrakte wurden hergestellt aus

1 anthocyanhaltigen 07-Kalluskulturen (System a, 2.5.1.2),
2 07-Petalen (Kontrolle) und
3 anthocyanhaltigen Daucus carota-Kalluskulturen (System c2).

Eine Ammoniumsulfatfällung veränderte dieses Ergebnis nicht, ebensowenig der Zusatz von BSA als Protease-Hemmer (Ergebnis nicht gezeigt).

Anscheinend liegen in den Kallusextrakten zahlreiche Proteine und Protein-Untereinheiten vor, die ausreichend antigene Eigenschaften besitzen, um mit dem CHS-Antikörper zu reagieren. Bei den Proteinen mit einem Molekulargewicht von unter 42 000 kann es sich dabei um CHS-Abbauprodukte handeln, die sich an der Pufferfront im Gel anhäufen. Da in den verwendeten Daucus carota-Zellen nach derselben Aufarbeitung hohe CHS-Enzymaktivitäten nachgewiesen werden können (Hinderer, 1982), liegt die Vermutung nahe, dass diese Abbauprodukte verstärkt beim weiteren Versuchsablauf (z.B. bei der Denaturierung der Proteine) entstehen. Aufgrund der zahlreichen Banden im höhermolekularen Bereich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass spezifische Kallus-Inhaltsstoffe die exakte Antigen-Antikörper-Erkennung stören. Im Falle einer veränderten CHS in Kalluszellen müsste man dagegen entweder überhaupt keine Bande oder eine andere als die Petalen-Bande erhalten, so dass diese Möglichkeit unwahrscheinlich ist.

3.4.6 Expression der CHS während der Blütenentwicklung

Die Expression der CHS während eines pflanzlichen Entwicklungsvorganges sollte am Beispiel der Blütenentwicklung gezeigt werden. Dazu wurden 07-Petalen der einzelnen Blütenstadien (2.1.2) aufgearbeitet (2.5.1.1, Aufarbeitung 1). Zur besseren Unterscheidung der Blütenstadien wurden in diesem Fall ausnahmsweise "einfache" Blüten (im Gegensatz zu "gefüllten" Blüten) verwendet.

In die Untersuchungen wurden auch Petalen aus sehr kleinen Knospen einbezogen. In jedem Fall wurde darauf geachtet, nur die Petalen ohne Sepalen und ohne Antheren zu verwenden. Mit SDS-PAGE (2.5.1), Protein-Blotting (2.5.2) und PAP-Färbung (2.5.3) konnte gezeigt werden, dass schon in Petalen von Stadium -1, also in den noch ungefärbten Petalen innerhalb einer geschlossenen Knospe, CHS-Enzymprotein vorhanden ist. Zwischen Stadium 0 und I nimmt - zeitgleich mit der beginnenden Färbung der Petalen - die Menge an CHS-Enzymprotein erheblich zu und bleibt dann während der folgenden Stadien konstant (Abb. 30). Damit müssten Petalen aus kleinen Knospen (Stadium -1 bis 0) besonders geeignet sein, CHS-spezifische mRNS zu isolieren.

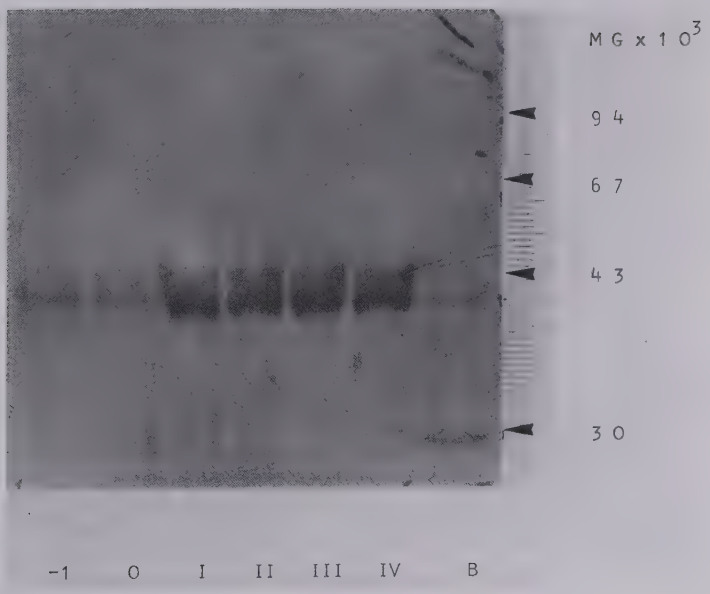


Abb. 30: Nachweis von CHS-Enzymprotein in verschiedenen Blüten-Entwicklungsstadien (-1 bis IV) und in Blättern (B) von Linie 07.

4 DISKUSSION

Die Expression von Genen stellt einen zentralen Aspekt der Differenzierung dar. Sie führt im typischen Fall zur zeitlich und räumlich koordinierten Entstehung von Proteinen. Dieser Prozess unterliegt einer quantitativen und qualitativen Steuerung durch zelleigene und exogene Faktoren. Dabei ist die Synthese eines speziellen Proteins nur möglich nach der Transkription des(r) entsprechenden Gens(e). Ein grundlegender, die Genexpression betreffender Faktor ist darum der Genotyp der Zelle bzw. der zur Transkription verfügbare Teil des Genoms. Dagegen ist als sehr wichtiger exogener Faktor für Pflanzen Licht zu nennen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden pflanzlichen Enzymproteine PAL und CHS untersucht, die an der Biosynthese von Flavonoiden entscheidenden Anteil haben. Ihre Expression in genetisch definierten Linien der Levkoje wurde hauptsächlich unter drei Gesichtspunkten gezeigt, nämlich in Abhängigkeit vom exogenen Stimulus Licht (PAL) und vom Genotyp der Linie (CHS), sowie während der Blütenentwicklung (CHS) als Beispiel eines komplexen pflanzlichen Entwicklungsprogramms. Die Untersuchungen wurden mit Keimlingen, Blüten und/oder Kalluszellen der Linien 01-10 und 17-19 von Matthiola incana durchgeführt.

4.1 Die Synthese von Anthocyanen in Matthiola incana

Die Komponenten eines pflanzlichen Flavonoidmoleküls entstehen über den allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel und über die (eigentliche) Flavonoidbiosynthesekette. Die Schlüsselenzyme dieser beiden Stoffwechselwege sind die PAL bzw. die CHS. U.a. durch die Aktivität dieser Enzyme können Flavonoide synthetisiert werden, zu denen die wichtige Gruppe der Anthocyane gehören. Daher wurde, unter Berücksichtigung des jeweiligen Genotyps, das Vorliegen von Anthocyanen in Keimlingen, Blüten und Kalluszellen von Matthiola incana untersucht. Dabei konnte für alle drei Versuchssysteme gezeigt werden, dass die Anthocyansynthese genetisch kontrolliert wird: Nur in Linien vom Genotyp $f^+f^+e^+e^+g^+g^+$, also in den Linien 01 bis 10, konnten spektralphotometrisch Anthocyane nachgewiesen werden. Dies sind in den b^+b^+-Linien Cyanidine (z.B. Linie 07), in den bb-Linien Pelargonidine (z.B. Linie 09). In den Linien 17 ($f^+f^+eeg^+g^+bb$) und 19 ($f^+f^+e^+e^+ggb^+b^+$) fehlen Anthocyane vollständig, wie auch durch Dünnschichtchromatographie gezeigt werden konnte (Leweke und Forkmann, 1982). Blüten und Kalluszellen der Linie 18 ($ffe^+e^+g^+g^+b^+b^+$) sind normalerweise ebenfalls anthocyanfrei. In mitunter auftretenden, hell-violetten 18-Petalen konnten jedoch spektralphotometrisch Anthocyane vom Cyanidin-Typ nachgewiesen werden. Mit den Cyanidin-Linien 01 bis 08 wurde ein chromatographischer Vergleich der Anthocyanmuster von Blüten und Kallusgewebe der jeweils entsprechenden Linie durchgeführt (Leweke und Forkmann, 1982). Dabei zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung. Zusätzlich zu den ausnahmslos acylierten Cyanidin-Glykosiden der Blüten enthält das Kallusgewebe der Linien 01, 02, 04 und 06 die entsprechenden, nicht acylierten Glykoside.

Bei den Linien 03, 05, 07 und 08 konnte dagegen überhaupt kein Unterschied im Anthocyanmuster festgestellt werden. Diese Linien enthalten entweder ausschliesslich nicht acylierte Cyanidin-Glykoside (07, 08: uuvv) oder zusätzlich zwei verschieden acylierte Glykoside (03, 05: uuv^+v^+). Die Linien 01 und 02 ($u^+u^+v^+v^+$) weisen ca. zehn, die Linien 04 und 06 (u^+u^+vv) drei verschieden acylierte Cyanidin-Glykoside auf. Damit scheinen in den Kalluszellen von Linien mit einer hohen Acylierungsaktivität (durch die genetische Konstitution $u^+u^+v^+v^+$ oder u^+u^+vv) die Gene u und v schwächer zu wirken.

Abgesehen vom Acylierungsgrad findet jedoch, im Gegensatz zu vielen anderen Systemen (vgl. Ball et al., 1972), in Kalluskulturen von Matthiola incana die Synthese derselben, Genotyp-spezifischen Anthocyane statt wie in Blüten. Da für die untersuchten Fragen vor allem das qualitative Ausmass der Anthocyansynthese wichtig war, konnten somit die drei Systeme Keimlinge, Blüten und Kalluskulturen wechselweise eingesetzt werden.

Anthocyane liegen gewöhnlich gelöst in den Vakuolen epidermaler Zellen vor, dies gilt auch für Matthiola. Für Petalen mehrerer Linien zeigt sich jedoch, dass die Anthocyane als Kristalle (Linie 06) oder in Anthocyanoblasten (Linie 02, 10, 14) abgelagert werden (Hemleben, 1981). Diese Linien sind vom Genotyp llu^+u^+ und bilden hauptsächlich acylierte 3-Bioside.

Für Erbsenblätter konnte anhand der Verteilung von Enzymen des Phenylpropan-Stoffwechsels und der Flavonoid-Biosynthese gezeigt werden, dass die Flavonoidsynthese wahrscheinlich nur in der Epidermis stattfindet (Hrazdina et al., 1982), und dass Chloroplasten daran nicht beteiligt sind (Hrazdina et al., 1980).

Untersuchungen mit Protoplasten aus Hippeastrum-Petalen ergaben, dass die Naringenin-Synthese im Cytosol stattfindet, und dass in den Vakuolen keine CHS-Enzymaktivität vorliegt. Für eine Flavonoid-Synthese (einschliesslich der Glykosidierung von Anthocyanidinen) im Cytosol sprechen auch die pH-Optima der beteiligten Enzyme(pH 7 oder darüber), die nicht dem niedrigen pH in den Vakuolen entsprechen (Hrazdina et al., 1978). Daher wird angenommen, dass im Cytosol die Phenylpropan- und die Flavonoid-Enzyme als Multienzymkomplexe vorliegen und mit dem endoplasmatischen Retikulum in Verbindung stehen (Hrazdina et al., 1978, 1982; Stafford, 1981).

4.2 Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase
- Induktion durch Licht und molekulare Charakterisierung -

An einer Reihe von pflanzlichen Systemen wurde gefunden, dass die PAL-Enzymaktivität durch exogene Faktoren beeinflusst werden kann (vgl. Einleitung). In sehr vielen Fällen konnte die PAL-Enzymaktivität durch Licht verändert werden (Obersicht bei Hanson und Havir, 1981).

Die Kausalkette zwischen dem exogenen Faktor "Licht" und der endogenen, messbaren Antwort "Änderung der PAL-Aktivität" konnte für keines der untersuchten Systeme lückenlos aufgeklärt werden. Für manche Pflanzen wurde die Beteiligung vom Phytochrom-System gezeigt. Tong und Schopfer (1978) fanden, dass in Senf-Kotyledonen (unter bestimmten Licht-Bedingungen) das $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$-Gleichgewicht die PAL-Syntheserate bestimmt. Die P_{fr}-Moleküle, die an der PAL-Induktion durch Lichtpulse beteiligt sind, sollen nur einen Teil des Phytochroms der Kotyledonen ausmachen und auf die untere Epidermis beschränkt sein. Die Kontrolle der PAL-de novo-Synthese durch Phytochrom in Senf-Kotyledonen (Acton und Schopfer, 1975; Schopfer, 1977) blieb allerdings nicht unwidersprochen. Johnson und Smith (1978) vertreten aufgrund von D_2O-Dichtemarkierungsexperimenten die Ansicht, dass Phytochrom die PAL-Synthese in Senf-Kotyledonen nicht stimuliert. Offensichtlich kann die Frage mit D_2O-Markierung nicht eindeutig gelöst werden (Hanson und Havir, 1981).

Weisslicht induziert die PAL-Enzymaktivität in etiolierten Keimlingen vieler dikotyler Pflanzen (z.B. Amrhein und Zenk, 1971). Dies konnte erwartungsgemäss auch für Keimlinge von Matthiola incana durch die vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden.

Der Induktionsverlauf kann nicht nur von Art zu Art verschieden sein, sondern auch entscheidend vom Alter der Keimlinge abhängen (Amrhein und Zenk, 1971). Für Matthiola-Keimlinge wurde in einem "typischen" Fall (Linie 10) ein schneller Anstieg der Enzymaktivität bis ca. 6 h nach dem Beginn der Belichtung beobachtet und innerhalb der nächsten 18 h wieder ein Abfall auf den Dunkelwert. Der höchste Wert liegt bei Keimlingen zwischen 2 und 3 µkat/kg Protein, was einer Steigerung um den Faktor 7 bis 10 entspricht (Linie 10, 17).
Ähnliche Ergebnisse wurden für Brassica oleracea-Keimlinge gefunden, die zur selben Pflanzenfamilie gehören. Hrazdina und Creasy (1979) beobachteten eine Zunahme der Enzymaktivität über 8 h um den Faktor 4 (Maximalwert 16 µkat/kg Protein, Belichtungsstart ca. 72 h nach Keimungsbeginn). Ähnliche Experimente mit Pisum-Keimlingen (Hrazdina und Parsons, 1982) zeigten einen langsameren Anstieg der PAL-Aktivität in 18 h auf ca. 1 µkat/kg Protein. Hanson und Havir (1981) überschlagen, dass es 3/4 bis 2 1/2 h dauern dürfte, bis im Fall einer Stimulation der Transkription genügend PAL-mRNS alle Processing-Stufen durchlaufen hat, die Ribosomen erreicht und eine PAL-Synthese entdeckt werden kann.

Für Matthiola-Keimlinge konnte zudem gezeigt werden, dass eine temporäre Abhängigkeit des Verlaufs der PAL-Enzymaktivität nach Lichtinduktion vorliegt. Dazu wurden Keimlinge derselben Linie (Linie 17) unterschiedlich lange im Dunkeln angezogen und dann belichtet. Der Induktionsverlauf bei 19 Tage alten Keimlingen verändert sich, verglichen mit jenem von nur 12 Tage alten Pflanzen dahingehend, dass die maximale Enzymaktivität erst nach Tagen erreicht wird und nur langsam wieder abfällt.

Dies stellt zweifellos eine Alterserscheinung der Keimlinge dar, die sich darüberhinaus auf Wasser nicht länger anziehen lassen. Sie zeigen offensichtlich eine stark verlangsamte Reaktion auf den exogenen Stimulus Licht. Bemerkenswert ist jedoch, dass alte und jüngere Keimlinge ein ähnlich hohes Aktivitätsmaximum zeigen. D.h. die durch Lichtinduktion maximal erreichbare PAL-Enzymaktivität (2-3 µkat/kg Protein) wird in beiden Fällen erlangt - in jüngeren Keimlingen allerdings wesentlich schneller als in alten. Mit anderen Systemen (Buchweizen-Hypokotyle; Amrhein und Zenk, 1971) wurde ein deutlicher Unterschied in der PAL-Induzierbarkeit zwischen 4 und 6 Tage alten Keimlingen gefunden (keine bzw. gute Induzierbarkeit). Anscheinend gibt es Phasen in den komplexen Entwicklungsprogrammen von Keimlingen, wo Licht nur sehr begrenzt oder überhaupt nicht in der Lage ist, PAL-Enzymaktivität zu induzieren. Bei der Vielzahl pflanzlicher Prozesse, die in vivo alle durch Licht gesteuert werden, erscheint dies auch nicht verwunderlich.

Für die Experimente mit Matthiola-Keimlingen wurden Kotyledonen mit dem anschliessenden Hypokotylstück (Länge 0,5 cm) aufgearbeitet. Eine getrennte Untersuchung von Hypokotylen und Kotyledonen wurde aus Materialgründen nicht durchgeführt. Hrazdina und Creasy (1979) fanden in Brassica-Keimlingen nach 15 h Belichtung den höchsten Anthocyangehalt in den Kotyledonen, jedoch die höchste spezifische PAL-Aktivität in den Hypokotyl-"Haken". Für Vigna-Keimlinge wird über Wechselwirkungen zwischen Hypokotyl und Kotyledonen bei der Anthocyansynthese berichtet (Dumortier und Vendrig, 1982).

In etiolierten Matthiola-Keimlingen der Linie 17 kann zwar die PAL-Enzymaktivität durch Licht induziert werden, die Synthese von Anthocyanen wurde jedoch nie beobachtet; dies steht mit dem ee-Genotyp der Linie in Einklang. Aus Untersuchungen an 17-Petalen wurde deutlich, dass in dieser Linie sehr wenig CHS-Enzymprotein vorliegt, obwohl die Flavonoidbiosynthesekette erst an einer späteren Stelle unterbrochen ist (2.1.1). Dies lässt vermuten, dass eine durch Licht erhöhte PAL-Enzymaktivität in Keimlingen ebenfalls nur auf den Phenylpropanstoffwechsel Einfluss nimmt. Der Frage, welche Produkte durch die gesteigerte Enzymaktivität entstehen, wurde jedoch bislang nicht nachgegangen.

Für 10 Tage alte, etiolierte Keimlinge der Linie 10 findet man demgegenüber, dass schon im Dunkeln Anthocyane vom Pelargonidin-Typ vorhanden sind, deren Menge durch Belichtung innerhalb der nächsten zehn Tage nicht wesentlich ansteigt (Ergebnis nicht gezeigt). Somit zeigen 10-Keimlinge zwar ein drastisches Ansteigen der PAL-Enzymaktivität durch Licht mit einem schnell darauffolgenden Abfall sowie die Synthese linienspezifischer Anthocyane; letztere findet jedoch auch im Dunkeln statt und erfährt durch Licht keine erhebliche Steigerung. Von anderen Linien stand nicht ausreichend Samenmaterial zur Verfügung, um dieser Frage nachzugehen. Es ist jedoch denkbar, dass sich die kurzzeitig erhöhte PAL-Aktivität ausschliesslich in der Synthese phenylpropanoider Verbindungen niederschlägt. Dies würde auch die Nicht-Induzierbarkeit der CHS durch Licht in Matthiola-Keimlingen erklären (s.u.).

Wie unter (3.3.2.2) beschrieben, konnte auch in Matthiola-Kalluskulturen die Induktion der PAL-Enzymaktivität durch Weisslicht gezeigt werden.

Im Unterschied zu Keimlingen wurden in den Kalluszellen ca. zehnmal so hohe Enzymaktivitäten gefunden. Nach 6 h Belichtung im Dunkeln angezogener Zellen wurden Werte von 20-30 µkat/kg Protein erreicht. Der Ursache dieser hohen Enzymaktivitäten wurde nicht nachgegangen, da quantitative Unterschiede in so verschieden komplexen Systemen wie Keimlingen und Kalluskulturen zu erwarten sind. Ein Einfluss von L-Phenylalanin, als einer der vielen möglicherweise relevanten Bestandteile des Kulturmediums der Kalluszellen, ist eher unwahrscheinlich. Dem Kulturmedium, ansonsten ohne Beigabe von Aminosäuren, war vorsorglich L-Phenylalanin (0,1 mg/l = 6×10^{-7}M) zugesetzt worden, obgleich Pflanzenzellen prinzipiell in der Lage sind, aromatische Aminosäuren zu synthetisieren. L-Phenylalanin stimuliert bei manchen Pflanzen die Produktion von Flavonoiden (Margna, 1977), während es bei Daucus-Suspensionskulturen diesen Effekt nicht zeigt (Noë, 1982). Aus in vitro-Untersuchungen des kinetischen Verhaltens der PAL aus verschiedenen Pflanzen ergab sich, dass das Enzym bezüglich seines Substrats negative Kooperativität zeigt (Übersicht bei Hanson und Havir, 1981). L-Phenylalanin scheint auf die Regulation der PAL-Aktivität keinen Einfluss zu haben.

Die dunkel angezogenen Matthiola-Kalluszellen (Linie 06, 10) zeigten eine typische Stimulierung der PAL-Enzymaktivität durch Weisslicht mit einem Maximum bei ca. 6 h. Jedoch konnte in den so stimulierten, im Dunkeln zuvor (optisch) anthocyanfreien Zellen während der nächsten Woche im Licht keine Bildung von Anthocyanen beobachtet werden. Dies kann von der 2,4-D-Konzentration im "Induktionsmedium" herrühren ($4,5 \times 10^{-7}$ M, Medium C; 2.7.1), die über der für die Anthocyansynthese im Dauerlicht optimalen Konzentration von 1×10^{-7} M (Leber, 1977) liegt.

Auf dem "normalen" Kulturmedium (Medium A; 2.7.1) mit der für die Anthocyansynthese optimalen Hormonzusammensetzung erfolgte im Dauerlicht in allen $f^+f^+e^+e^+g^+g^+$-Linien die Ausbildung Genotyp-spezifischer Anthocyane (s.o.). Gemäss ihrem ee-Genotyp entstanden in Kalluskulturen der Linie 17 nie Anthocyane.
Die Kalluskulturen von Matthiola erwiesen sich damit aus zwei Gründen als geeignet, Fragen der Lichtinduktion der PAL-Enzymaktivität nachzugehen. Einmal liegen die spezifischen PAL-Aktivitäten wesentlich höher als in Keimlingen; zum anderen zeigen die Kalluszellen, verglichen mit Keimlingen, einen nahezu identischen Induktionsverlauf (Linie 06, 10), falls die Untersuchungen zu dem für jedes System und jede Linie optimalen Zeitpunkt durchgeführt werden (z.B. 10-Keimlinge: ca. 14 Tage Dunkelanzucht; 06, 10-Kalli: ca. 16 Tage Dunkelanzucht). Jedes System verändert sich empfindlich mit dem Alter der Versuchsobjekte. Dies wurde mit 17-Keimlingen gezeigt und stellt vermutlich die Ursache dar für den abweichenden Induktionsverlauf bei 17-Kalluszellen nach 16 Tagen Dunkelanzucht.

Fragen, die die Lichtinduktion der PAL in Zellkulturen betreffen, wurden am besten untersucht an Petersilie-Zellsuspensionskulturen (Betz et al., 1978).
Zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Kulturperiode von Petroselinum-Suspensionskulturen werden durch Belichtung Enzyme der Gruppe I (die Enzyme des Phenylpropan-Stoffwechsels) und später die Enzyme der Gruppe II (die Enzyme der eigentlichen Flavonoid-Biosynthese) koordiniert induziert. Die Enzyme der Gruppe I (z.B. die PAL) erreichen dabei ihre maximale Aktivität mehrere Stunden früher und fallen in ihrer Aktivität schneller wieder ab als die Enzyme der Gruppe II (z.B. die CHS) (Hahlbrock, 1981).

Die Induzierbarkeit der PAL (ebenso wie die der CHS) verändert sich erheblich während des Wachstums der Kultur und erreicht kurz vor dem Erreichen der stationären Phase ihr Maximum, ca. 90 µkat/kg Protein. Unter bestimmten Bedingungen deckt sich dann der Verlauf der Flavonoid-Akkumulation mit den integrierten Werten der PAL-Aktivität. Daraus kann geschlossen werden, dass unter bestimmten Versuchsbedingungen die PAL das "rate-limiting" Enzym der Flavonoid-Synthese darstellt.

Die lichtinduzierte Änderung der PAL-Enzymaktivität beruht auf einer zeitweilig erhöhten Rate der de novo-Synthese des Enzyms (Betz et al., 1978; Schröder et al., 1979). Der Induktion der PAL-Enzymaktivität geht dabei eine Induktion von PAL-mRNA voraus. Die zu beobachtende Lag-Phase der PAL-Aktivität beträgt 2 h. Die PAL-Synthese beginnt zwar unmittelbar mit Belichtung, jedoch kann ihre Zunahme während der ersten Stunden der mRNA-Induktion nicht bemerkt werden (Betz et al., 1978). Nach ca. 17 h wird die maximale Enzymaktivität beobachtet, die innerhalb der nächsten 8 h wieder auf 20% des Maximalwertes abfällt. Die Halbwertszeiten der PAL und der CHS wurden von Schröder et al. (1979) mit 5-10 h angegeben.
Die Induktion der Aktivität der Gruppe I- und Gruppe II-Enzyme von Petersilie-Zellsuspensionskulturen erfolgt nur unter der Beteiligung von UV-Licht, welches auch alleine zur Induktion ausreicht (Hahlbrock, 1981). Neben Phytochrom wurde einem Photorezeptor für Blaulicht die Beteiligung an der UV-induzierten Flavonoidsynthese in Petersiliezellen nachgewiesen (Duell-Pfaff und Wellmann, 1982).
Entsprechende Versuche, durch Licht mit einem hohen Blau-Anteil (Leuchtstofflampen Philips TL 40W/18, ca. 4000 Lux)die Anthocyansynthese in Matthiola-Kallus-kulturen zu verstärken,schlugen fehl.

Weder Dauerbelichtung noch Dunkelanzucht (14 Tage) und anschliessende Belichtung auf Medium A (2.7.1) führten zum Erfolg. Auf längere Blaulicht-Behandlung reagieren die Kalluszellen mit Braunfärbung und vermindertem Wachstum.

Die PAL wurde nicht nur im pflanzlichen Cytoplasma, sondern auch in Plastiden, Mitochondrien und Microbodies nachgewiesen. Besonders mit den Chloroplasten können anscheinend erhebliche Teile der PAL-Aktivität assoziiert sein (Übersicht bei Hanson und Havir, 1981).

Mit Hilfe eines PAL-spezifischen Antiserums konnte in Matthiola-Petalen und in Matthiola-Kalluskulturen PAL-Enzymprotein unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität nachgewiesen und eine Grössenbestimmung der PAL-Untereinheiten durchgeführt werden. Aufgrund der erhaltenen Daten liessen sich drei Hypothesen aufstellen, die im folgenden diskutiert werden.

Zu Annahme 1 ("das 82 000-Protein stellt die intakte PAL-Untereinheit in Matthiola dar")

Das Molekulargewicht der PAL-Untereinheiten (nach SDS-Mercaptoäthanol-Behandlung des gereinigten, intakten Enzyms und SDS-PAGE mit Referenzproteinen) wurde für eine Vielzahl von Pflanzen (z.B. für Kartoffel, Mais, Petersilie, Sojabohne) und einige Pilze bestimmt. Das Molekulargewicht einer Untereinheit liegt dabei im Regelfall bei 83 000, das intakte Enzym besteht aus vier identischen oder sehr grössenähnlichen Untereinheiten (Hanson und Havir, 1981). Bei einer Reihe von Systemen wurde jedoch ebenfalls von zusätzlichen (kleineren) Untereinheiten berichtet (z.B. beim Weizen: MG 85 000 und 75 000; Nari et al., 1972). Gereinigte PAL aus Petersilie-Suspensionskulturen spaltete nach SDS-PAGE häufig auf in Proteine mit dem MG 83 000, 65 000, 55 000 und 42 000, was auf die Instabilität der grossen Untereinheiten zurückgeführt wurde (Zimmermann und Hahlbrock, 1975).

Durch Immunpräzipitation konnte aus lichtinduzierten Petersilie-Zellen PAL mit (fast ausschliesslich) 83 000-Untereinheiten isoliert werden; mit Polysomen aus belichteten Zellen erhielt man in in vitro-Translationsansätzen dagegen zusätzliche radioaktive Peaks bei MG 65 000, 55 000 und 42 000. Letzteres könnte entweder auf Abbauprozesse oder auf unvollständige Translationsabläufe zurückzuführen sein (Schröder et al., 1976). Hanson und Havir (1981, unveröffentlicht) beobachteten bei der Aufbewahrung gereinigter PAL aus Mais eine Zunahme an kleineren Proteinen. Laut Zimmermann und Hahlbrock (1975) können dafür auch unterschiedliche SDS-Mercaptoäthanol-Behandlungen verantwortlich sein.

Würde man vor diesem Hintergrund Annahme 1 zustimmen, würde die Forderung lauten, dass in jeder Matthiola-Linie PAL-Untereinheiten mit einem MG von ca. 82 000 nachweisbar sein müssten, da PAL-Mutationen vermutlich letal sind. Dies konnte für alle untersuchten Linien gezeigt werden, ausser für Linie 05 (aufgrund einer zu schwachen PAP-Färbung) und für Kallusgewebe. Die Bande(n) in Bereich B müsste(n) dann umso stärker sein, je mehr Abbauprodukte vorliegen. Dies war bei Petalen von Linie 17 besonders deutlich, wo die 72 500-Bande stets sehr ausgeprägt war (stärker als bei der ebenfalls weissblühenden Linie 18) und bei Kalluszellen. Dieser Fall könnte dann eintreten, wenn gegenüber "normalen" Linien

- der Rohextrakt einer Linie besonders Protease-aktiv ist bzw. das betreffende PAL-Enzym gegen Proteasen ungewöhnlich empfindlich ist
- in der betreffenden Linie weniger aktive PAL benötigt wird (dies könnte u.U. für die weissblühenden Linien und für Kallusgewebe zutreffen; dabei ist der Vergleich zwischen Petalen und Kalluszellen problematisch, da geeignete Bezugsgrössen fehlen)
- die betreffende Linie eine erhöhte PAL-"turnover"-Rate aufweist.

Zu Annahme 2 ("das 72 500-Protein stellt die intakte PAL-Untereinheit dar")

Nimmt man an, dass die reifen PAL-Untereinheiten ein MG von 72 500 aufweisen, was der prominenten Bande im Bereich B entspricht, kann man das MG des intakten Matthiola-Enzyms grob mit 72 500 x 4 = 290 000 schätzen. Dieser Wert stimmt gut überein mit Angaben für zwei andere Brassicaceen: Für Raphanus sàtivus-Kotyledonen wurde das MG des gereinigten, intakten und laut PAGE homogenen Enzyms durch Chromatographie an Sepharose 6B mit 290 000±5% bestimmt (Fourcroy, 1980).

Wurde dabei die Ionenstärke des Puffers verändert, so wurden auch höhermolekulare Aggregate beobachtet, die jedoch interkonvertibel waren. Ein inaktiver Precursor für PAL wird für Raphanus ausgeschlossen. Schopfer (1971) berichtete über die elektrophoretisch einheitliche PAL von Sinapis alba mit einem MG von 300 000 (nach Sepharose 6B). Durch eine Verringerung der Ionenstärke konnte die PAL reversibel in eine höhermolekulare Form gebracht werden. Gupta und Acton (1979) geben die Untereinheit desselben Enzyms mit 55 000, die des intakten aktiven Enzyms mit 240 000± 9 000 an (bzw. mit 60 000/ 280 000 je nach den verwendeten Eichproteinen). Höhermolekulare Aggregate (wie bei Schopfer) wurden nicht beobachtet. Ein proteolytischer Abbau einer grösseren Untereinheit während der Reinigung kann jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die isoelektrische Fokussierung der Senf-PAL zeigte einen Haupt-Peak bei pH 5,6. Ein Nebenpeak bei pH 5,3 wurde nicht untersucht. Das Enzym zeigt im Gegensatz zu vielen anderen keine negative Kooperativität zu seinem Substrat. Aufgrund dieser Sinapis-Daten erwägen Hanson und Havir (1981) u.a. die Möglichkeit, dass die 83 000-Untereinheit des Enzyms eine terminale Sequenz enthält, die weder für die katalytische Funktion noch für die Assoziation der Untereinheiten notwendig ist. Die kleinen Senf-Untereinheiten könnten dann aus der grossen "Standard"-Untereinheit vor oder nach der Faltung entstehen. Die kleineren Untereinheiten könnten theoretisch auch eine primitivere PAL-Form darstellen, für die eine kürzere codierende Sequenz vorliegt.

Aufgrund der vorliegenden Daten war es nicht möglich, Annahme 2 eindeutig vor Annahme 1 den Vorrang zu geben; jedoch muss in Anbetracht der geschilderten Ergebnisse für andere Brassicaceen erwogen werden, ob aktive PAL aus Matthiola sich (auch oder ausschliesslich) aus Untereinheiten mit einem MG von ca. 72 500 zusammensetzt.

Zu Annahme 3 ("zwei verschiedene PAL-Enzyme in Matthiola")

Während für viele Pflanzen über eine einheitliche PAL berichtet wurde (s.o.), liegen auch Berichte vor über mehrere PAL-Formen mit unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften und verschiedener zellulärer Lokalisation, die nach DEAE-Sephadex-Chromatographie gefunden wurden (z.B. Quercus; Alibert et al., 1972). Für Spinatblätter wurden drei PAL-Formen angenommen. die bei DEAE-Cellulose-Chromatographie auftraten (Nishizawa et al., 1979).

Ahmed und Swain (1970) vermuteten aufgrund von Ammoniumsulfat-Fraktionierungsergebnissen zwei PAL-Formen in belichteten Mungbohnen. Jedoch wurden in keinem Fall Molekulargewichtsbestimmungen durchgeführt, somit kann kein Vergleich zu den Matthiola-Ergebnissen hergestellt werden. Vorläufig ist darum keine zwingende Notwendigkeit gegeben, zwei verschiedene PAL-Formen in Matthiola anzunehmen.

4.3 Die Chalkonsynthase

Parallel zur PAL als dem Schlüsselenzym des Phenylpropanstoffwechsels, wurde die CHS, das Eingangsenzym der Flavonoidsynthese, untersucht.

Für verschiedene Pflanzen konnte gezeigt werden, dass die CHS im Cytoplasma lokalisiert ist (Hrazdina et al., 1978; 1980). Das Molekulargewicht des gereinigten Enzyms aus Petroselinum-Zellsuspensionskulturen liegt bei 77 000. Über SDS-PAGE wurde das Molekulargewicht der beiden CHS-Untereinheiten festgestellt. Der Wert 42 000 wurde aus Versuchen mit dem gereinigten, Coomassie-gefärbten Enzym, ferner mit der in vivo und in vitro mit (^{35}S)Methionin-markierten, immunopräzipitierten CHS erhalten (Kreuzaler et al., 1979). Entsprechend wurde 42 500 für die Enzym-Untereinheiten aus Phaseolus-Suspensionskulturen (Lawton et al., 1983a) und 41 000 für die CHS-Untereinheiten aus Soja-Zellen (Hille et al., 1982) bestimmt.

Die Matthiola-CHS konnte ebenfalls mit dem gegen Petroselinum-CHS gerichteten Antiserum charakterisiert werden. Die Spezifität des verwendeten Serums wurde anhand seiner Hemmung von CHS-Enzymaktivität in CHS-aktiven Matthiola-Blütenextrakten demonstriert.

Die eindeutige Immunpräzipitation von CHS-Untereinheiten wurde durch die Grössenbestimmung (s.u.) des präzipitierten Proteins gezeigt. Im Petersilie-System war die Spezifität des Serums gegen Petersilie-CHS mehrfach untersucht worden (Kreuzaler et al., 1979). In den heterologen Systemen Phaseolus und Soja (s.o.) konnte mit diesem Serum ebenfalls eindeutig CHS präzipitiert werden.

Durch die Kombination der Methoden SDS-PAGE, Protein-Blotting und PAP-Färbung konnte so CHS-Enzymprotein (d.h. CHS-Untereinheiten) in Matthiola-Petalen und -Blättern (vgl. Abb. 30) zweifelsfrei nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht der CHS-Untereinheiten von Matthiola wurde mit 41 500 bestimmt (aus 42 Einzeldaten zwischen 39 500 und 43 000). Es stimmt damit sehr gut überein mit den für andere Pflanzen ermittelten Werten. Tendenzmässig weisen dabei die Untereinheiten aus weissen Petalen (Linie 17, 18 und 19) ein leicht niedrigeres Molekulargewicht auf. Zwischen der 18-CHS aus weissen und aus violetten Petalen konnte kein Unterschied festgestellt werden (vgl. Abb. 27). Der Frage, ob die CHS-Untereinheiten bzw. das funktionsfähige Enzymprotein sich in den einzelnen Linien nicht doch ganz geringfügig unterscheiden, muss noch mit sensibleren Auftrennungsmethoden nachgegangen werden; sie konnte anhand der vorliegenden Daten nicht entschieden werden.

Die CHS in Matthiola-Petalen verwendet ausschliesslich p-Cumaroyl-CoA als Co-Substrat für die Synthese des C_{15}-Grundgerüsts der Flavonoide. Dies ist unabhängig von den Verhältnissen am Locus b, der über die Hydroxylierung in 3'-Position entscheidet.

Damit trifft für Matthiola, ebenso wie für genetisch definierte Linien von Antirrhinum majus und von Dianthus caryophyllus, die Substitutionshypothese zu (Spribille, 1982). Die CHS in Silene dioica zeigt demgegenüber eine erweiterte Substratspezifität und setzt sowohl p-Cumaroyl-CoA, als auch Kaffeoyl-CoA um (Kamsteeg et al., 1980). Über das genetisch kontrollierte Angebot dieser Zimtsäuren erfolgt in diesem Fall die Genotyp-spezifische Synthese von Cyanidinen oder Pelargonidinen. Für Silene trifft damit die Zimtsäure-Starthypothese (Hess, 1968) zu. Für viele andere Systeme wurde in vitro ebenfalls eine erweiterte Substratspezifität der CHS gefunden. Ohne die genetischen Grundlagen zu kennen, kann daraus jedoch nicht auf die Verwirklichung der Zimtsäurestarthypothese geschlossen werden. Die CHS aus Tulpen-Antheren kann in vitro p-Cumaroyl-CoA, Kaffeoyl-CoA und Feruloyl-CoA in die entsprechenden Chalkone umsetzen; diese werden auch in vivo akkumuliert (Sütfeld und Wiermann, 1980).
Am besten wurde die CHS aus Petersilie-Zellsuspensionskulturen untersucht. Bei pH 8 verwertet das Enzym ausschliesslich p-Cumaroyl-CoA als Substrat, bei pH 6,5 in gleichem Umfang zusätzlich Kaffeoyl-CoA (Saleh et al., 1978). In vitro findet man neben dem vollständigen Reaktionsprodukt Naringenin auch Produkte mit einer oder zwei Acetat-Einheiten weniger (Hrazdina et al., 1976). Die CHS katalysiert in vitro einen CO_2-Austausch und die Decarboxylierung von Malonyl-CoA. Aufgrund intensiver Untersuchungen mit gereinigter CHS konnte der Reaktionsmechanismus des Enzyms vorgeschlagen werden (Hrazdina et al., 1976; Hahlbrock, 1981). Die Petroselinum-CHS enthält weder ein Acyl-Carrier-Protein noch einen Pantetheinyl-Rest (Kreuzaler et al., 1979).

4.4 Die Expression der CHS in genetisch definierten Matthiola-Linien

Flavonoide können in allen Teilen einer Pflanze vorkommen. Dementsprechend konnte mit den genannten Methoden CHS-Enzymprotein in den Blättern von Matthiola nachgewiesen werden (Linie 07).

Die Expression der CHS in Petalen wurde in Abhängigkeit vom Genotyp der betreffenden Linie untersucht. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle Angaben auf den Gesamtprotein-Gehalt der Rohextrakte.
In Petalen (Stadium III-IV) aller Anthocyan synthetisierender Linien liegt CHS-Enzymprotein in annähernd gleicher Menge vor (bezogen auf Frischgewicht oder auf Proteingehalt). Man geht davon aus, dass die Synthese aller Flavonoide über die Stufe der Chalkone/Flavanone läuft (Hahlbrock und Grisebach, 1975; Forkmann, 1979; Hahlbrock, 1981). Darum muss in anthocyanhaltigen Petalen das Vorliegen von CHS-Enzymprotein erwartet werden, was durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt wurde.

Die Matthiola-Linien 17 (Genotyp $f^+f^+eeg^+g^+$) und 19 ($f^+f^+e^+e^+gg$) sind weissblühend aufgrund einer späten Unterbrechung des Anthocyanbiosyntheseweges nach der Bildung der Dihydroflavonole. Die CHS-Enzymaktivität in diesen Petalen liegt niedriger als in entsprechenden Petalen Anthocyan bildender Linien (Spribille, 1982). Sie beträgt nur ca. 25% der dort zu beobachtenden Werte (Forkmann; persönliche Mitteilung). In 17- und 19-Petalen liegt, verglichen mit "farbigen" Petalen, drastisch weniger CHS-Enzymprotein vor. Aufgrund der PAP-Färbungen wurde durch Vergleich mit verdünnten 04-Extrakten grob eine Verringerung um den Faktor 30 geschätzt.

Stets enthielten 17- und 19-Petalen gleich wenig Enzymprotein. Somit wird deutlich, dass in den beiden weissblühenden Linien 17 und 19 die CHS einem Regulationsmechanismus unterliegt. Aufgrund der genannten Daten kann man schliessen, dass ihre Synthese reguliert wird, da man weniger Enzym-Untereinheiten und gleichzeitig weniger Enzymaktivität beobachtet.

Die ebenfalls weissblühende Linie 18 wurde intensiv untersucht, weil in dieser Linie am Locus f, der die Chalkonsynthase betrifft, rezessive Allele vorliegen. In Petalen konnte keine CHS-Enzymaktivität gefunden werden (Spribille, 1982). Versuche, durch Immunpräzipitation indirekt Enzymaktivität nachzuweisen, bestätigten dieses Ergebnis. Durch Protein-Blotting und PAP-Färbung konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass in weissen 18-Petalen erhebliche Mengen an CHS-Enzymprotein vorliegen und zwar 3-4 mal mehr als in weissen 17- oder 19-Petalen.

Unter bestimmten Stress-Bedingungen wie z.B. Kälte, bilden 18-Pflanzen zart-violette Blüten aus, die Anthocyane vom Cyanidin-Typ enthalten. CHS-Enzymaktivität konnte jedoch auch dort bislang nicht gefunden werden. Aufgrund des Auftretens von Anthocyanen muss dennoch gefordert werden, dass, zumindest während eines bestimmten Stadiums der sich entwickelnden und später violett färbenden Petalen, CHS-Enzymaktivität vorliegt. In violetten 18-Petalen liegt zudem CHS-Enzymprotein vor und zwar gleichviel wie in weissen 18-Petalen.

Feststeht damit, dass im allgemeinen in 18-Petalen relativ viel CHS-Enzymprotein vorliegt, jedoch keine aktive CHS. Dies stellt eine deutlich andere Situation dar im Vergleich zu den beiden anderen, immer weissblühenden Linien 17 und 19 und kann wie folgt schematisch dargestellt werden:

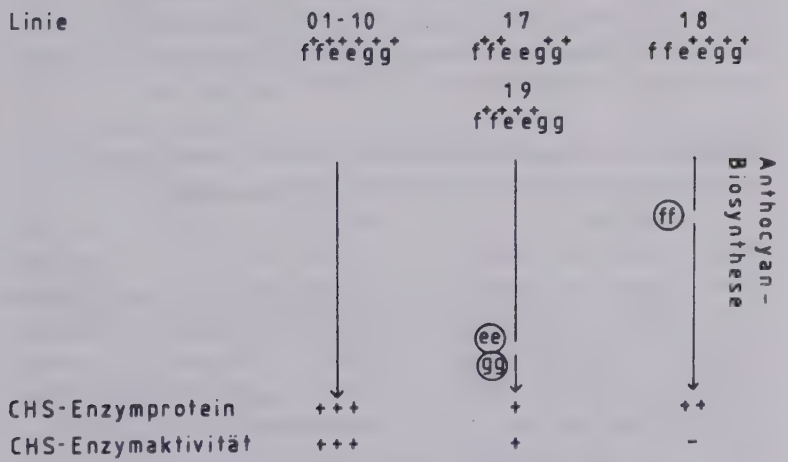


Abb. 31: CHS-Enzymprotein und CHS-Enzymaktivität in genetisch definierten Matthiola-Linien.

Zusammenfassend gilt:
Linie 18 synthetisiert in Petalen ein Protein, dessen Untereinheiten spezifisch mit einem CHS-Antiserum präzipitierbar sind. Das Molekulargewicht dieser Untereinheiten stimmt mit dem der CHS-Untereinheiten aus enzymatisch aktiven Linien überein. In zart-violetten Petalen sind solche Untereinheiten in gleicher Menge vorhanden wie in weissen 18-Petalen. Die Färbung der Petalen kann nur über eine - möglicherweise zeitlich begrenzte - enzymatische Aktivität der CHS erklärt werden, wofür der experimentelle Beweis noch aussteht. Denn auch durch andere Test-Bedingungen (veränderte Enzym-/Substrat-Konzentrationen; Kaffeoyl-CoA als Substrat) konnte in weissen 18-Petalen bislang keine CHS-Enzymaktivität nachgewiesen werden (Spribille, 1982). Dennoch müssen mit anthocyanhaltigen 18- Petalen in dieser Hinsicht weitere Tests durchgeführt werden (z.B. bei veränderten Ionen-, pH- und Temperatur-Verhältnissen und mit verschiedenen Blütenstadien).

Verschiedene Denkmöglichkeiten bieten sich nun an, die Versuchsergebnisse mit Linie 18 zu deuten:

Möglichkeit 1

Linie 18 unterscheidet sich auf DNS-Ebene von den anderen Linien. Das Gen f ist mutiert. Es entsteht ein verändertes CHS-Enzymprotein. Dieses besitzt zwar ausreichend antigene Eigenschaften, um mit dem CHS-Antiserum zu reagieren, die komplette CHS weist jedoch keine oder eine äusserst geringe Enzymaktivität auf. Unter veränderten "Arbeits"-Bedingungen ist die vorhandene CHS dagegen in der Lage, Naringenin-Chalkon zu synthetisieren. Oder unter diesen Bedingungen wird aktive CHS de novo synthetisiert. Die Tatsache, dass in weissen und in violetten 18-Petalen gleiche Mengen an CHS-Enzymprotein nachgewiesen werden können, sprechen eher für eine Verwendung bereits vorhandenen Enzyms.
Die Möglichkeit eines veränderten Gens f kann über seine Klonierung und Charakterisierung untersucht werden; entsprechende Versuche in unserer Arbeitsgruppe sollen dies klären.

Möglichkeit 2

Linie 18 stellt eine Processing-Mutante dar, bei der im Laufe der Processing-Schritte der prä-CHS-mRNS ein Fehler vorkommt. Die sich daraus ergebenden Konsequenzen entsprechen jenen von Möglichkeit 1.
Über die Isolierung CHS-spezifischer mRNS und die Charakterisierung ihrer Translationsprodukte wird diese Möglichkeit in unserem Labor untersucht.

Möglichkeit 3

Der Assembly-Prozess der CHS-Untereinheiten ist in Linie 18 gestört. Dabei könnten in weissen 18-Petalen intakte oder fehlerhafte Untereinheiten (z.B. entstanden nach Theorie 1 oder 2) in ihrer Zusammenlagerung zu einem funktionsfähigen Enzymprotein behindert sein. In den violetten 18-Petalen hätte dann der Assembly-Prozess (zufällig?) zu einem gewissen Teil funktioniert.

Möglichkeit 4

In weissen 18-Petalen ist die CHS durch einen Inhibitor in ihrer enzymatischen Aktivität gehemmt. Unter bestimmten Bedingungen ist der Inhibitor inaktiv(iert), und die Petalen können Anthocyane synthetisieren. Aufgrund von Mischexperimenten schliesst Spribille (1982) jedoch für Matthiola einen Inhibitor als Ursache für den Ausfall der Enzymaktivität aus.

Das Problem inaktiver CHS wurde in Petroselinum-Zellsuspensionskulturen untersucht (Schröder und Schäfer, 1980). Dort wurde mit Hilfe von radiojodierten CHS-Antikörpern die Gesamtmenge an CHS-Enzymprotein bestimmt. Nichtinduzierte Dunkel-Zellen enthalten weder immunopräzipitierbare noch aktive CHS. Bei lichtinduzierten Zellen zeigte sich jedoch, dass aktive CHS (bestimmt über ihre enzymatische Aktivität) und Gesamt-CHS (bestimmt durch Immunpräzipitation) sich in ihrem Induktionsverlauf und in ihren Halbwertszeiten unterscheiden. Dies liess den Schluss zu, dass induzierte Zellen unterschiedliche Mengen an inaktivem Enzym enthalten. Dabei rührt die CHS-Enzymaktivität, die man nach Belichtung findet, ausschliesslich von einer de novo-Synthese des Enzyms her.

Eine Precursor-Rolle der inaktiven CHS kann ausgeschlossen werden. Nach der wahrscheinlicheren der beiden aufgestellten Modellvorstellungen, dem "Sequential Model", wird die inaktive CHS auch nicht gleichzeitig mit der aktiven CHS (Halbwertszeit 6 h) synthetisiert, sondern stellt deren inaktivierte Form dar, die schliesslich weiter abgebaut wird (Halbwertszeit 18 h). Aktive und inaktive CHS unterscheiden sich in der Grösse ihrer Untereinheiten nicht (Molekulargewicht 42 000), woraus geschlossen werden kann, dass der Inaktivierungsschritt eine kleinere Modifikation, vielleicht am reaktiven Zentrum, umfasst. Beide Enzymformen sollen genauer untersucht werden.
Aufgrund exakt einstellbarer Induktionsbedingungen konnte somit für das Petroselinum-System die Beteiligung inaktiver CHS an der lichtinduzierten CHS-Aktivitätssteigerung ausgeschlossen werden. Ergebnisse mit Matthiola-Blüten der Linie 18 sind demgegenüber schwieriger zu interpretieren, da die genauen Bedingungen nicht bekannt sind, die von einer weissen zu einer violetten Färbung der Petalen führen. Bislang können nur weisse und bereits sichtbar violette Petalen untersucht werden. Bisher erfolglose Versuche, durch bestimmte Stressbedingungen (z.B. Kälte) Anthocyansynthese in 18-Kalluskulturen zu induzieren, müssen deshalb intensiviert werden. Dennoch erscheint es aufgrund der genannten Daten am unwahrscheinlichsten, dass die inaktive CHS in weissen Petalen der Linie 18 eine inaktivierte, zuvor enzymatisch aktive Enzymform darstellt. Die Möglichkeiten 1 und 2 werden darum auf DNS- bzw. RNS-Ebene geprüft.

Die die CHS betreffenden, im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Versuche, waren sämtliche mit Matthiola-Petalen durchgeführt worden. Dagegen erwies sich der Nachweis der CHS in Keimlingen und Kalluskulturen als problematisch.

Etiolierte Keimlinge zeigten nach Blaulicht-Bestrahlung keine erhöhte CHS-Enzymaktivität und wurden daher nicht näher untersucht. Zahlreiche Versuche, CHS-Enzymaktivität in Kalluskulturen nachzuweisen, schlugen fehl. Untersucht worden waren "frische", anthocyanhaltige Kalluszellen (Linie 07) aus Dauerlicht-Bedingungen, ferner 13-15 Tage im Dunkeln angezogene und dann mit Weiss- oder Blaulicht bestrahlte Kulturen der Linien 03, 04, 06, 07 und 17. Offensichtlich liegen auch in Anthocyan-synthetisierenden Kalluszellen nur sehr geringe CHS-Enzymaktivitäten vor bzw. wurde für die Induktion von CHS-Enzymaktivität nicht der richtige Modus gefunden. Über die Schwierigkeiten, mit Immunpräzipitation CHS-Untereinheiten in Matthiola- und Daucus-Kalluskulturen nachzuweisen, wurde im Ergebnisteil berichtet.

4.5 Die Expression der CHS während der Blütenentwicklung

Untersuchungen, die die Korrelation zwischen der Expression eines Sekundärstoffwechselweges und der Entwicklung eines Organismus, Organs oder Gewebes zum Gegenstand haben, sind von besonderem Interesse. Sie liefern Anhaltspunkte für Entwicklungsprozesse in natürlichen, jedoch sehr komplexen Systemen. Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel umfasst dabei die Biosynthese, den Transport, Umwandlungen, die Akkumulation und den Abbau bestimmter Produkte (Wiermann, 1981). Im Gegensatz zu Untersuchungen an "künstlichen" Systemen wie Zellkulturen, sind bei Versuchen mit ganzen Pflanzen(-teilen) die Effekte, die diese einzelnen Teilprozesse hervorrufen, oftmals experimentell nicht ohne weiteres voneinander zu trennen.

Vielmehr kann der beobachtete Vorgang, z.B. die Anthocyanakkumulation in einem pflanzlichen Gewebe, das Ergebnis des Zusammenwirkens mehrerer oder aller genannter Komponenten sein.

Für Untersuchungen, die die Flavonoidsynthese in ganzen Pflanzen betreffen, stellen anthocyanhaltige Blüten ein geeignetes Versuchsobjekt dar. Die Differenzierung und Pigmentierung von Blüten ist ein Beispiel, wie die Biosynthese und die Akkumulation von Sekundärstoffen an bestimmte Entwicklungsstadien eines Organs gekoppelt sein können.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Vorliegen von CHS-Enzymprotein in Petalen unterschiedlich weit entwickelter Knospen bzw. Blüten von Linie 07 untersucht. Ein Problem stellt dabei die notwendige Definition von Blütenstadien dar (2.1.2). Eine Einteilung in Entwicklungsstadien erscheint sinnvoller als eine rein zeitliche Einteilung, was wiederum bedeutet, dass die Abstände zwischen den einzelnen Stadien nicht linear sind. Dies trägt jedoch der Tatsache Rechnung, dass zum Erreichen der einzelnen Blütenstadien unterschiedlich viel Zeit benötigt wird (zwischen einigen Stunden und mehreren Tagen).
Bereits in den anthocyanfreien Petalen der beiden kleinsten untersuchten Knospenstadien -1 und 0 kann eindeutig CHS-Enzymprotein nachgewiesen werden. Dabei sind in Knospen von Stadium -1 die Petalen noch vollständig von grünlichen Kelchblättern umschlossen. Zwischen Stadium 0 und I, zeitgleich mit der einsetzenden Lilafärbung der Petalen, nimmt die Menge an CHS-Enzymprotein erheblich zu und bleibt dann über die restlichen Entwicklungsstadien konstant. Auf das Petalen-Frischgewicht bezogen, nimmt die CHS-Menge ca. um den Faktor 5 zu. In Petalen von Stadium 0 wird der höchste Gesamtprotein-Gehalt beobachtet (bezogen auf Frischgewicht), der danach kontinuierlich abnimmt.

In älteren Petalen macht somit CHS-Enzymprotein einen zunehmend grösseren Anteil am Gesamtprotein aus (Abb. 32).

Die CHS-Enzymaktivität betreffend konnte gezeigt werden, dass die höchste Aktivität (bezogen auf Frischgewicht) in Petalen von Stadium I bis II auftritt (Spribille, 1982; dort Stadium 2 und 3) und danach abfällt. (Sehr junge Petalen wurden nicht auf ihre Enzymaktivität und sehr alte Petalen nicht auf das Vorliegen von Enzymprotein getestet, so dass in diesem Bereich kein Vergleich möglich ist). Vorläufig steht damit fest, dass in Petalen, die erstmals sehr viel CHS-Enzymprotein aufweisen, auch eine hohe CHS-Enzymaktivität zu beobachten ist. Darauffolgend, etwa ab Stadium III, nimmt die Enzymaktivität ab und der Anthocyangehalt der Petalen erreicht seinen Maximalwert, während die Menge an immunologisch nachweisbarem Enzymprotein konstant bleibt. Die Inaktivierung von CHS in älteren Petalen ist daher wahrscheinlich. Auch andere, ebenfalls an der Flavonoidsynthese beteiligte Enzyme zeigen einen charakteristischen Aktivitätsverlauf während der Blütenentwicklung von Matthiola (Dangelmayr et al., im Druck).

Eine entwicklungsabhängige, sukzessiv aufeinanderfolgende Akkumulation von Phenylpropanen, Chalkonen und schliesslich Anthocyanen wurde während der Mikrosporogenese von Tulipa cv. "Apeldoorn" beobachtet. Entsprechend fand man Aktivitätsmaxima für Enzyme, die zur Synthese der stadienspezifischen Sekundärprodukte benötigt werden (Wiermann, 1981).

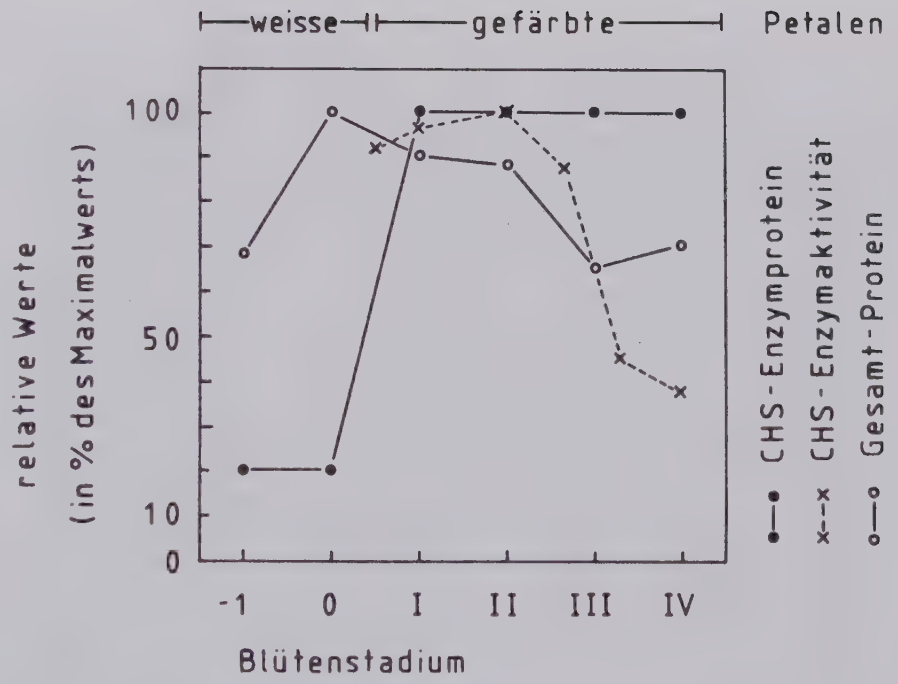


Abb. 32: Die Expression der CHS während der Blütenentwicklung, gezeigt am Vorliegen von CHS-Enzymprotein (Linie 07) und von CHS-Enzymaktivität in verschiedenen Blüten-Entwicklungsstadien. Die Werte für den Verlauf der CHS-Enzymaktivität (nach Spribille, 1982) wurden möglichst gut den hier verwendeten Blütenstadien zugeordnet. Alle Angaben sind auf das Petalen-Frischgewicht bezogen.

Ergebnisse dieser Art spiegeln natürliche Induktionsvorgänge wider, die während der vielschichtigen pflanzlichen Entwicklungsprogramme ablaufen. Dabei bleiben die endogenen Regulationsvorgänge nach wie vor unklar, da sie experimentell schwierig zu fassen sind. Für Matthiola wurde gezeigt, dass die Expression der CHS stadienspezifisch erfolgt, d.h. mit morphologischen (Blütenentwicklung) und physiologischen (Anthocyansynthese) Differenzierungsvorgänge einhergeht.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel hervorgehenden Flavonoide stellen typische, ökologisch und physiologisch bedeutsame Inhaltsstoffe höherer Pflanzen dar.
Die vorliegende Arbeit umfasst Untersuchungen zur Flavonoid- bzw. Anthocyanbiosynthese in der Levkoje, Matthiola incana (Brassicaceae). Dafür standen genetisch definierte Matthiola-Linien zur Verfügung. Diese weisen entweder keine (Linie 01-10) oder verschieden lokalisierte Unterbrechungen der Anthocyanbiosynthese auf. Linie 18 ist durch eine "frühe" Unterbrechung am Chalkonsynthase-Gen (= Gen f) charakterisiert; die Linien 17 und 19 zeigen eine "späte" Unterbrechung (nach der Bildung der Dihydroflavonole) am Gen e bzw. g.
Die Anthocyanbiosynthese wurde in Keimlingen, Blüten und aus Wurzelspitzen angelegten Kalluskulturen untersucht, die unterschiedlich komplexe Versuchssysteme darstellen. Dabei standen die Enzyme Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) und Chalkonsynthase (CHS) im Mittelpunkt des Interesses, da sie die Schlüsselenzyme des Phenylpropanstoffwechsels (PAL) bzw. der eigentlichen Flavonoidbiosynthese (CHS) darstellen.

Folgende Zusammenhänge konnten gezeigt werden:

- Die Anthocyanbiosynthese in Keimlingen, Blüten und Kalluskulturen von Matthiola erfolgt quantitativ unterschiedlich, jedoch in jedem Fall Genotyp-spezifisch: In b^+b^+-Linien (Linie 01-08) werden Cyanidine, in bb-Linien (Linie 09 und 10) Pelargonidine synthetisiert; in den Linien 17 (Genotyp ee), 18 (ff)(Ausnahme s.u.) und 19 (gg) sind keine Anthocyane vorhanden.

- Die genetische Kontrolle der Anthocyanbiosynthese ist unabhängig von den Licht-Bedingungen. In etiolierten Keimlingen von Linie 17 (Genotyp ee) kann die Anthocyanbiosynthese auch durch Belichtung mit Weisslicht nicht induziert werden.

- PAL-Enzymaktivität ist sowohl in Licht- als auch in Dunkel-Keimlingen/Kalluskulturen nachweisbar, wobei Kalluszellen unter den gewählten Kulturbedingungen zehnmal höhere Enzymaktivitäten aufweisen.
  PAL, als das Schlüsselenzym des Phenylpropanstoffwechsels, ist in allen Linien vorhanden. Das Vorkommen der PAL ist somit unabhängig vom Genotyp der Linie und ihrer Fähigkeit zur Anthocyansynthese.

- PAL-Enzymaktivität kann in Matthiola durch Weisslicht stimuliert werden. Sowohl für Anthocyan-synthetisierende Linien als auch für Linie 17 wurde gezeigt, dass in Dunkel-Keimlingen und -Kalluszellen die PAL-Enzymaktivität durch Belichtung innerhalb von ca. 6 h bis um den Faktor 10 erhöht werden kann. Der zeitliche Verlauf der PAL-Enzymaktivität ist für beide Systeme sehr ähnlich, jedoch quantitativ unterschiedlich und stark abhängig vom Alter des Pflanzenmaterials.

- In allen Linien wurde PAL-Enzymprotein durch Immunpräzipitation mit einem PAL-spezifischen Antiserum nachgewiesen. Das Molekulargewicht der PAL-Untereinheiten wurde mit 72 500 bis 82 000 bestimmt (nach SDS/Mercaptoäthanol-Behandlung und Polyacrylamid-Gelelektrophorese).

- CHS-Enzymaktivität konnte in Petalen-Rohextrakten spezifisch durch Immunpräzipitation mit einem CHS-Antiserum gehemmt werden. CHS-Enzymaktivität ist demnach in Petalen der f^+f^+-Linien (f = CHS-Gen) vorhanden, fehlt jedoch in Petalen von Linie 18 (Genotyp ff).

Linie 18 war aufgrund von früheren Kreuzungsexperimenten und chemogenetischen/enzymologischen Untersuchungen als CHS-Mutante erkannt worden.

- Unabhängig von einer enzymatischen Aktivität wurde CHS-Enzymprotein durch Immunpräzipitation in Petalen sämtlicher untersuchter Linien gefunden, d.h. in farbigblühenden Linien und in den weissblühenden Linien 17, 18 und 19. Auch in Blättern liegen geringe Mengen an CHS-Enzymprotein vor. Das Molekulargewicht der identischen CHS-Untereinheiten beträgt ca. 42 000 (nach SDS/Mercaptoäthanol-Behandlung und Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Mit den verwendeten Auftrennungsmethoden konnte zwischen den einzelnen Linien kein Unterschied im Molekulargewicht der CHS-Untereinheiten festgestellt werden.

- Die anthocyanfreien Linien 17 und 19 (Genotyp ee bzw. gg), in denen die Anthocyansynthese zu einem "späten" Zeitpunkt genetisch blockiert ist, weisen in Petalen nur ca. 3% an CHS-Enzymprotein der farbigblühenden Linien auf. Da gleichzeitig die CHS-Enzymaktivität verringert ist (Forkmann, persönliche Mitteilung), ist ein Regulationsmechanismus wahrscheinlich, der in 17- und 19-Petalen die CHS-Synthese betrifft.

- Die im allgemeinen ebenfalls weissblühende Linie 18 (Genotyp ff) weisst gegenüber den Linien 17 und 19 in Petalen 3-4 mal mehr CHS-Enzymprotein auf, jedoch konnte keine CHS-Enzymaktivität gefunden werden. Dasselbe gilt für mitunter auftretende, sich zartviolett färbende 18-Petalen, deren Pigmentierung - dem b^+b^+-Genotyp der Linie entsprechend - auf Cyanidinen beruht.

Dies wiederum kann nur durch eine (möglicherweise zeitlich beschränkte) CHS-Enzymaktivität erklärt werden. Weder mengenmässig noch im Molekulargewicht kann ein Unterschied zwischen dem CHS-Enzymprotein in weissen und in violetten 18-Petalen festgestellt werden.

- Linie 18 verhält sich demzufolge wie eine temperatursensitive Mutante, in der unter bestimmten Stress-Bedingungen (vermutlich bereits vorhandene) CHS enzymatisch aktiv wird. Dies wäre erklärbar durch eine Mutation auf DNS-Ebene (Punktmutation, Regulationsmutanté) oder durch einen Processing-Fehler, die zu einer sehr grössenähnlichen, aber normalerweise enzymatisch nicht aktiven CHS (-Untereinheit) führen.

- Die Expression des CHS-Gens ist eng mit der Blütenentwicklung korreliert. Bereits in noch anthocyanfreien, vollständig von Kelchblättern umschlossenen Petalen ist CHS-Enzymprotein vorhanden (Linie 07). Mit fortschreitender Blütenentwicklung und einsetzender Färbung der Petalen nimmt die CHS-Menge um den Faktor 5 zu und bleibt dann konstant (bei gleichzeitig sinkendem Gesamtprotein-Gehalt).
In Petalen aus weit entwickelten Blüten wird die CHS offensichtlich zunehmend inaktiv(iert), wobei sich die immunologische Nachweisbarkeit und das Molekulargewicht der CHS-Untereinheiten nicht verändert, was auf einen "geringfügigen" Modifikationsschritt schliessen lässt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Acton, G.J., Schopfer, P.: Control over activation or synthesis of phenylalanine ammonia-lyase by phytochrome in mustard (Sinapis alba L.)? A contribution to eliniminate some misconceptions.
Biochim.Biophys.Acta 404, 231-242 (1975)

Ahmed, S.I., Swain, T.: The effect of light on the activity of enzymes of the aromatic pathway in peas and mung beans.
Phytochem. 9, 2287-2290 (1970)

Akazawa, T., Miyata, S.: Biosynthesis and secretion of α-amylase and other hydrolases in germinating cereal seeds.
Essays in Biochemistry 18, 40-78 (1982)

Alibert, G., Ranjeva, R., Boudet, A.: Recherches sur les enzymes catalysant la formation des acides phénoliques chez Quercus pedunculata (Ehrh.) II.
Biochim.Biophys.Acta 279, 282-289 (1972)

Amrhein, N., Zenk, M.H.: Untersuchungen zur Rolle der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) bei der Regulation der Flavonoidsynthese im Buchweizen (Fagopyrum esculentum Moench).
Z.Pflanzenphysiol. 64, 145-168 (1971)

Amrhein, N., Gödeke, K.-H., Kefeli, V.I.: The estimation of relative intracellular phenylalanine ammonia-lyase (PAL)-activities and the modulation in vivo and in vitro by competitive inhibitors.
Ber.Deutsch.Bot.Ges. 89, 247-259 (1976)

Amrhein, N., Gerhardt, J.: Superinduction of phenylalanine ammonia-lyase in gherkin hypocotyls caused by the inhibitor L-α-aminooxy-β-phenylpropionic acid.
Biochim.Biophys.Acta 583, 434-442 (1979)

Austin, S.A., Kay, J.E.: Translational regulation of protein synthesis in eukaryotes.
Essays in Biochemistry 18, 79-120 (1982)

Baglioni, C.: Interferon-induced enzymatic activities and their role in the antiviral state.
Cell 17, 255-264 (1979)

Ball, E.A., Harborne, J.B., Arditti, J.: Anthocyanins of Dimorphotheca (Compositae). I. Identity of pigments in flowers, stems, and callus cultures.
Amer.J.Bot. 59, 924-930 (1972)

Beevers, L.: Post-translational modifications.
In: Nucleic Acids and Proteins in Plants I: Structure, Biochemistry and Physiology of Proteins, Boulter, D., Parthier, B. (eds.), 136-168.
Springer-V., Berlin/Heidelberg (1982)

Betz, B., Schäfer, E., Hahlbrock, K.: Light-induced phenylalanine ammonia-lyase in cell-suspension cultures of Petroselinum hortense. Quantitative comparison of rates of synthesis and degradation.
Arch.Biochem.Biophys. 190, 126-135 (1978)

Bewley, J.D.: Protein and nucleic acid synthesis during seed germination and early seedling growth.
In: Nucleic Acids and Proteins in Plants I: Structure, Biochemistry and Physiology of Proteins, Boulter, D., Parthier, B. (eds.), 559-591.
Springer-V., Berlin/Heidelberg (1982)

Blobel, G., Dobberstein, B.: Transfer of proteins across membranes I., II..
J.Cell Biol. 67, 835-851 und 852-862 (1975)

Bogorad, L., Weil, J.H. (eds.): Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants.
Plenum Press New York (1977)

Bogorad, L., Jolly, S.O., Kidd, G., Link, G., McIntosh, L.: Organisation and transcription of maize chloroplast genes.
In: Genome Organization and Expression in Plants, Leaver, C.J. (ed.), 291-304.
Plenum Press New York (1980)

Conn, E.E. (ed.): Secondary Plant Products. The biochemistry of plants - A comprehensive treatise, Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds.), vol. 7.
Academic Press New York (1981)

Crawford, I.P., Stauffer, G.V.: Regulation of tryptophan biosynthesis.
Ann.Rev.Biochem. 49, 163-195 (1980)

Dangelmayr, B., Stotz, G., Spribille, R., Forkmann, G.: Relationship between flower development, anthocyanin accumulation and activity of enzymes involved in flavonoid biosynthesis in Matthiola incana R.Br.
Z.Naturforsch., im Druck

Dickson, R.C., Abelson, J., Barnes, W.M., Reznikoff, W.S.: Genetic regulation: The lac control region.
Science 187, 27-35 (1975)

Dobberstein, B., Blobel, G., Chua, N.-H.: In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of Chlamydomonas reinhardtii.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 1082-1085 (1977)

Duell-Pfaff, N., Wellmann, E.: Involvement of phytochrome and a blue light photoreceptor in UV-B induced flavonoid synthesis in parsley (Petroselinum hortense Hoffm.) cell suspension cultures.
Planta 156, 213-217 (1982)

Dumortier, F.M., Vendrig, J.C.: Anthocyanin synthesis in seedlings of Vigna radiata (L.) Wilczek: Interaction between hypocotyl and cotyledons.
Plant and Cell Physiology 23, 759-765 (1982)

Dyer, T.A., Bedbrook, J.R.: The organisation in higher plants of the genes coding for chloroplast ribosomal RNA.
In: Genome Organization and Expression in Plants, Leaver, C.J. (ed.), 305-311.
Plenum Press New York (1980)

Ellis, R.J., Smith, S.M., Barraclough, R.: Synthesis, transport and assembly of chloroplast proteins.
In: Genome Organization and Expression in Plants, Leaver, C.J. (ed.), 321-335.
Plenum Press New York (1980)

Evans, M.I., Hager, L.J., McKnight, G.S.: A somatomedin-like peptide hormone is required during the estrogen-mediated induction of ovalbumin gene transcription.
Cell 25, 187-193 (1981)

Felsenfeld, G., McGhee, I.: Methylation and gene control.
Nature 296, 602-603 (1982)

Forkmann, G.: Precursors and genetic control of anthocyanin synthesis in Matthiola incana R.Br..
Planta 137, 159-163 (1977)

Forkmann, G.: Flavanones and dihydroflavonols as biosynthetic intermediates in Matthiola incana.
Phytochem. 18, 1973-1975 (1979)

Forkmann, G.: The B-ring hydroxylation pattern of intermediates of anthocyanin synthesis in pelargonidin- and cyanidin-producing lines of Matthiola incana.
Planta 148, 157-161 (1980)

Forkmann, G.: Genetic control of enzymes involved in flavonoid biosynthesis.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 362, 12 (1981)

Forkmann, G., Kuhn, B.: Genetic control of chalcone isomerase activity in anthers of Petunia hybrida. Planta 144, 189-192 (1979)

Forkmann, G., Dangelmayr, B.: Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of Dianthus caryophyllus. Biochem.Genet. 18, 519-527 (1980)

Forkmann, G., Heller, W., Grisebach, H.: Anthocyanin biosynthesis in flowers of Matthiola incana, flavanone 3- and flavonoid 3'-hydroxylases. Z.Naturforsch. 35c, 691-695 (1980)

Fourcroy, P.: Properties of L-phenylalanine ammonia-lyase and turnover rate in etiolated and far-red illuminated seedlings of radish. Biochim.Biophys.Acta 613, 488-498 (1980)

Friedrich, H.H., Hemleben, V., Key, J.L.: Restriction mapping of ribosomal RNA genes of higher plants. In: Genome and Chromatin: Organization, evolution, function, Nagl, W., Hemleben, V., Ehrendorfer, F. (eds.). Plant Syst.Evol., Suppl. 2, 73-88 (1979)

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp.Cell.Research 50, 151-158 (1968)

Gerats, A.G.M., de Vlaming, P., Doodeman, M., Al, B., Schram, A.W.: Genetic control of the conversion of dihydroflavonols into flavonols and anthocyanins in flowers of Petunia hybrida. Planta 155, 364-368 (1982)

Gollmer, I.: Untersuchungen zur Genexpression während der Entwicklung und Differenzierung der Blütenpflanze Matthiola incana (Brassicaceae). Dissertation, Tübingen (1980)

Gradmann-Rebel, W., Hemleben, V.: Incorporation of T_4 phage DNA into a specific DNA fraction from the higher plant Matthiola incana. Z.Naturforsch. 31c, 558-564 (1976)

Grisebach, H.: Recent developments in flavonoid biosynthesis. In: Pigments in Plants, Czygan, F.-C. (ed.), 187-209. G. Fischer Verlag, Stuttgart (1980)

Grisebach, H., Barz, W.: Biochemie der Flavonoide. Naturwiss. 56, 538-544 (1969)

Gross, M.: The control of protein synthesis by hemin in rabbit reticulocytes.
Mol.Cell.Biochem. 31, 25-36 (1980)

Gupta, S., Acton, G.J.: Purification to homogeneity and some properties of L-phenylalanine ammonia-lyase of irradiated mustard (Sinapis alba L.) cotyledons.
Biochim.Biophys.Acta 570, 187-197 (1979)

Hahlbrock, K.: Flavonoids.
In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds.), vol. 7, 425-456.
Academic Press New York (1981)

Hahlbrock, K., Wellmann, E.: Light-independent induction of enzymes related to phenylpropanoid metabolism in cell suspension cultures from parsley.
Biochim.Biophys.Acta 304, 702-706 (1973)

Hahlbrock, K., Grisebach, H.: Biosynthesis of flavonoids.
In: The Flavonoids, Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. (eds.), 866-915.
Academic Press New York (1975)

Hahlbrock, K., Schröder, J.: Specific effects on enzyme activities upon dilution of Petroselinum hortense cell cultures into water.
Arch.Biochem.Biophys. 171, 500-506 (1975)

Hahlbrock, K., Knobloch, K.-H., Kreuzaler, F., Potts, J.R.M., Wellmann, E.: Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interrelated enzymes.
Eur.J.Biochem. 61, 199-206 (1976)

Hahlbrock, K., Grisebach, H.: Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids.
Ann.Rev.Plant Physiol. 30, 105-130 (1979)

Hahlbrock, K., Schröder, J., Vieregge, J.: Enzyme regulation in parsley and soybean cell cultures.
In: Advances in Biochemical Engineering, Fiechter, A. (ed.), vol. 18: Plant Cell Cultures II, 39-60.
Springer-V., Berlin/Heidelberg (1980)

Hahlbrock, K., Lamb, C.J., Purwin, C., Ebel, J., Fautz, E., Schäfer, E.: Rapid response of suspension-cultured parsley cells to the elicitor from Phytophthora megasperma var. sojae. Induction of the enzymes of general phenylpropanoid metabolism.
Plant Physiol. 67, 768-773 (1981)

Hanson, K.R., Havir, E.A.: Phenylalanine ammonia-lyase.
In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds.), vol. 7, 577-625.
Academic Press New York (1981)

Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. (eds.): The Flavonoids.
Academic Press New York (1975)

Hartley, M.R., Wheeler, A., Ellis, R.J.: Protein synthesis in chloroplasts V. Translation of messenger RNA for the large subunit of fraction I protein in a heterologous cell-free system.
J.Mol.Biol. 91, 67-77 (1975)

Heller, W., Hahlbrock, K.: Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone.
Arch.Biochem.Biophys. 200, 617-619 (1980)

Hemleben, V.: Anthocyanin carrying structures in specific genotypes of Matthiola incana R.Br..
Z.Naturforsch. 36c, 925-927 (1981)

Hemleben, V., Ermisch, N., Kimmich, D., Leber, B., Peter, G.: Studies on the fate of homologous DNA applied to seedlings of Matthiola incana.
Eur.J.Biochem. 56, 403-411 (1975)

Hemleben, V., Leweke, B., Roth, A., Stadler, J.: Organization of highly repetitive satellite DNA of two Cucurbitaceae species (Cucumis melo and Cucumis sativus).
Nucl.Acids Res. 10, 631-644 (1982a)

Hemleben, V., Frey, M., Rall, S., Koch, M., Kittel, M., Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Hahlbrock, K.: Studies on the chalcone synthase gene of two higher plants: Petroselinum hortense and Matthiola incana.
In: Embryonic Development Part B: Cellular aspects, Burger, M.M., Weber, R. (eds.), 555-566.
Alan R. Liss New York (1982b)

Hess, D.: Blütenfarbstoffe als Modelle für die Wirkungsweise von Genen. I. Chemische Konstitution und chemische Genetik der Anthocyane.
Umschau 64, 758-762 (1964)

Hess, D.: Blütenfarbstoffe als Modelle für die Wirkungsweise von Genen. II. Die Biosynthese der Anthocyane.
Umschau 65,49-53 (1965)

Hess, D.: Biochemische Genetik.
Springer-V., Berlin/Heidelberg (1968)

Hille, A., Purwin, C., Ebel, J.: Induction of enzymes of phytoalexin synthesis in cultured soybean cells by an elicitor from Phytophthora megasperma f. sp. glycinea.
Plant Cell Reports 1, 123-127 (1982)

Hinderer, W.: Regulation der Chalconsynthase durch einen Inhibitor bei anthocyanhaltigen Kalluszellen der Karotte.
Diplomarbeit, Tübingen (1982)

Ho, T.-h.D.: Hormonal and genetic regulation of α-amylase synthesis in barley aleurone cells.
In: Genome Organization and Expression in Plants, Leaver, C.J. (ed.), 147-157. Plenum Press New York (1980)

Hrazdina, G., Kreuzaler, F., Hahlbrock, K., Grisebach, H.: Substrate specificity of flavanone synthase from cell suspension cultures of parsley and structure of release products in vitro.
Arch.Biochem.Biophys. 175, 392-399 (1976)

Hrazdina, G., Wagner, G.J., Siegelman, H.W.: Subcellular localization of enzymes of anthocyanin biosynthesis in protoplasts.
Phytochem. 17, 53-56 (1978)

Hrazdina, G., Creasy, L.L.: Light induced changes in anthocyanin concentration, activity of phenylalanine ammonia-lyase and flavanone synthase and some of their properties in Brassica oleracea.
Phytochem. 18, 581-584 (1979)

Hrazdina, G., Alscher-Herman, R., Kish, V.M.: Subcellular localization of flavonoid synthesizing enzymes in Pisum, Phaseolus, Brassica and Spinacia cultivars.
Phytochem. 19, 1355-1359 (1980)

Hrazdina, G., Marx, G.A., Hoch, H.C.: Distribution of secondary plant metabolites and their biosynthetic enzymes in pea (Pisum sativum L.) leaves. Anthocyanins and flavonol glycosides.
Plant Physiol. 70, 745-748 (1982)

Hrazdina, G., Parsons, G.F.: Induction of flavonoid synthesizing enzymes by light in etiolated pea (Pisum sativum cv. Midfreezer) seedlings.
Plant Physiol. 70, 506-510 (1982)

Ingle, J., Timmis, J.N., Sinclair, J.:
The relationship between satellite deoxyribonucleic acid, ribosomal ribonucleic acid gene redundancy, and genome size in plants.
Plant Physiol. 55, 496-501 (1975)

Isenberg, I.: Histones.
Ann.Rev.Biochem. 48, 159-191 (1979)

Jacob, F., Monod, J.: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.
J.Mol.Biol. 3, 318-356 (1961)

Johnson, C.B., Smith, H.: Phytochrome control of amino acid synthesis in cotyledons of Sinapis alba.
Phytochem. 17, 667-670 (1978)

Kamsteeg, J., van Brederode, J., van Nigtevecht, G.: Genetical and biochemical evidence that the hydroxylation pattern of the anthocyanin B-ring in Silene dioica is determined at the p-coumaroyl-coenzyme A stage.
Phytochem. 19, 1459-1462 (1980)

Kappert, H.: Die Genetik des incana-Charakters und der Anthozyanbildung bei der Levkoje.
Züchter 19, 289-297 (1949)

Kittel, M.: Isolierung und Charakterisierung stadienspezifischer Messenger-RNA aus Matthiola incana (Brassicaceae).
Diplomarbeit, Tübingen (1981)

Koshland, D.E.: The molecular basis for enzyme regulation. Theory and models of allosteric regulation.
In: The Enzymes, Boyer, P.D. (ed.), 3rd ed., vol. 1, 341-396. Acad. Press New York (1970)

Koukol, J., Conn, E.E.: The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare.
J.Biol.Chem. 236, 2692-2698 (1961)

Kreuzaler, F., Hahlbrock, K.: Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: Formation of naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanone) from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A.
FEBS Letters 28, 69-72 (1972)

Kreuzaler, F., Hahlbrock, K.: Enzymic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavanone synthase from cell-suspension cultures of Petroselinum hortense.
Eur.J.Biochem. 56, 205-213 (1975a)

Kreuzaler, F., Hahlbrock, K.: Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants. Formation of bisnoryangonin (4-hydroxy-6(4-hydroxystyryl)2-pyrone) from p-coumaroyl-CoA and malonyl-CoA.
Arch.Biochem.Biophys. 169, 84-90 (1975b)

Kreuzaler, F., Ragg, H., Heller, W., Tesch, R., Witt, I., Hammer, D., Hahlbrock, K.: Flavanone synthase from Petroselinum hortense. Molecular weight, subunit composition, size of messenger RNA, and absence of pantetheinyl residue.
Eur.J.Biochem. 99, 89-96 (1979)

Kuhn, B., Forkmann, G., Seyffert, W.: Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in Callistephus chinensis.
Planta 138, 199-203 (1978)

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685 (1970)

Langridge, P., Pintor-Toro, J.A., Feix, G.: Transcriptional effects of the opaque-2 mutation of Zea mays L..
Planta 156, 166-170 (1982)

Larkins, B.A.: Seed storage proteins: Characterization and biosynthesis.
In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds.), vol. 6, 449-489.
Academic Press New York (1981)

Lawton, M.A., Dixon, R.A., Hahlbrock, K., Lamb, C.: Rapid induction of the synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and of chalcone synthase in elicitor-treated plant cells.
Eur.J.Biochem. 129, 593-601 (1983a)

Lawton, M.A., Dixon, R.A., Hahlbrock, K., Lamb, C.: Elicitor induction of mRNA activity. Rapid effects of elicitor on phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA activities in bean cells.
Eur.J.Biochem. 130, 131-139 (1983b)

Leaver, C.J., (ed.): Genome Organization and Expression in Plants.
Plenum Press New York (1980)

Leaver, C.J., Forde, B.G.: Mitochondrial genome expression in higher plants.
In: Genome Organization and Expression in Plants. Leaver, C.J. (ed.), 407-425.
Plenum Press New York (1980)

Leber, B.: Entwicklung eines geeigneten pflanzlichen Donor-Rezipienten-Systems für den Nachweis der Aufnahme, Integration und Expression von exogener homologer DNS.
Dissertation, Tübingen (1977)

Leber, B., Hemleben, V.: Uptake of homologous DNA into nuclei of seedlings and by isolated nuclei of a higher plant.
Z.Pflanzenphys. 91, 305-316 (1979)

Lee, N.L., Gielow, W.O., Wallace, R.G.: Mechanism of araC autoregulation and the domains of two overlapping promotors, P_C and P_{BAD}, in the L-arabinose regulatory region of Escherichia coli.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78, 752-756 (1981)

Leweke, B., Forkmann, G.: Genetically controlled anthocyanin synthesis in cell cultures of Matthiola incana.
Plant Cell Reports 1, 98-100 (1982)

Leweke, B., Hemleben, V.: Organization of rDNA in chromatin: Plants.
In: The Cell Nucleus, vol. XI: rDNA, Part B, Busch, H., Rothblum,L(eds.), 225-253.
Academic Press New York (1982)

Lewin, B. (ed.): Gene Expression, vol. 2: Eucaryotic chromosomes.
John Wiley & Sons, London (1974)

Lodish, H.F.: Translational control of protein synthesis.
Ann.Rev.Biochem. 45, 39-72 (1976)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265-275 (1951).

Margna, U.: Control at the level of substrate supply - an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells.
Phytochem. 16, 419-426 (1977)

Mathis, D., Oudet, P., Chambon, P.: Structure of transcribing chromatin.
Progr.Nucl.Acid Res.Mol.Biol. 24, 1-55 (1980)

Matile, P.: Protein degradation.
In: Nucleic Acids and Proteins in Plants I: Structure, biochemistry and physiology of proteins, Boulter, D., Parthier, B. (eds.), 169-188.
Springer-V., Berlin/Heidelberg (1982)

McIntosh, L., Poulsen, C., Bogorad, L.: Chloroplast gene sequence for the large subunit of ribulose bisphosphatecarboxylase of maize.
Nature 288, 556-560 (1980)

Miège, M.-N.: Protein types and distribution:
In: Nucleic Acids and Proteins in Plants I: Structure, biochemistry and physiology of proteins, Boulter, D., Parthier, B. (eds.), 291-345.
Springer-V., Berlin/Heidelberg (1982)

Mohr, H.: Phytochrome and gene expression.
In: Cell Compartimentation and Metabolic Channelling, Nover, L., Lynen, F., Mothes, K. (eds.).
G. Fischer Verlag und Elsevier/North-Holland Biomed. Press Jena und Amsterdam (1980)

Müntz, K.: Seed development.
In: Nucleic Acids and Proteins in Plants I: Structure, biochemistry and physiology of proteins, Boulter, D., Parthier, B. (eds.), 505-558.
Springer-V. Berlin/Heidelberg (1982)

Nari, J., Mouttet, Ch., Pinna, M.H., Ricard, J.: Some physicochemical properties of L-phenylalanine ammonia-lyase of wheat seedlings.
FEBS Letters 23, 220-224 (1972)

Nishizawa, A.N., Wolosiuk, R.A., Buchanan, B.B.: Chloroplast phenylalaninie ammonia-lyase from spinach leaves.
Planta 145, 7-12 (1979)

Noé, W.: Regulation der Phenylalanin-Ammonium-Lyase bei Anthocyan-haltigen Zellsuspensionskulturen von Daucus carota (L.).
Dissertation, Tübingen (1982)

Noé, W., Seitz, H.-U.: Induction of de novo synthesis of phenylalanine ammonia-lyase by L-α-aminooxy-β-phenyl-propionic acid in suspension cultures of Daucus carota L.
Planta 154, 454-458 (1982)

Nover, L., Luckner, M., Parthier, B.: Cell Differentiation: Molecular basis and problems.
Springer-V., Berlin/Heidelberg (1982a)

Nover, L., Richter, R.F., Serfling, E.: Structure and expression of immunoglobulin genes.
Biol.Zentralblatt 101, 27-55 (1982b)

Ochoa, S., de Haro, C.: Regulation of protein synthesis in eukaryotes.
Ann.Rev.Biochem. 48, 549-580 (1979)

Olden, K., Yamada, K.M.: Direct detection of antigens in sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gels. Anal.Biochem. 78, 483-490 (1977)

O'Malley, B.W., Towle, H.C., Schwartz, R.J.: Regulation of gene expression in eukaryotes. Ann.Rev.Genet. 11, 239-275 (1977)

Pérez-Bercoff, R.: Protein Biosynthesis in Eukaryotes. Plenum Press New York (1982)

Prescott, D.M., Goldstein, L. (eds.): Cell Biology - A comprehensive treatise, vol. 4: Gene expression: Translation and the behavior of proteins. Academic Press New York (1980)

Quetier, F., Vedel, F.: Physico-chemical and restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from higher plants. In: Genome Organization and Expression in Plants, Leaver, C.J. (ed.), 401-406. Plenum Press New York (1980)

Ramshaw, J.A.M.: Structures of plant proteins. In: Nucleic Acids and Proteins in Plants I: Structure, Biochemistry and Physiology of Proteins, Boulter, D., Parthier, B. (eds.), 229-290. Springer-V., Berlin/Heidelberg (1982)

Razin, A., Riggs, A.D.: DNA methylation and gene function. Science 210, 604-610 (1980)

Revel, M., Groner, Y.: Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes. Ann.Rev.Biochem. 47, 1079-1126 (1978)

Rissland, I., Mohr, H.: Phytochrom-induzierte Enzymbildung (Phenylalanindesaminase), ein schnell ablaufender Prozess. Planta 77, 239-249 (1967)

Roach, P.J.: Principles of the regulation of enzyme activity. In: Cell Biology - A comprehensive treatise, vol. 4: Gene expression: Translation and the behavior of proteins, Prescott, D.M., Goldstein, L. (eds.), 203-297. Academic Press New York (1980)

Russell, E.S.: Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. Advanc. Genetics 20, 375-495 (1979)

Ryan, C.A.: Proteinase inhibitors.
In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds.), vol. 6, 351-370.
Academic Press New York (1981)

Ryan, C.A., Walker-Simmons, M.: Plant proteinases.
In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds.), vol. 6, 321-350.
Academic Press New York (1981)

Saleh, N.A.M., Fritsch, H., Kreuzaler, F., Grisebach, H.: Flavanone synthase from cell suspension cultures of Haplopappus gracilis and comparison with the synthase from parsley.
Phytochem. 17, 183-186 (1978)

Schleif, R.F., Wensink, P.C.: Working with proteins.
In: Practical Methods in Molecular Biology, 61-88.
Springer-V., New York (1981)

Schopfer, P.: Die Phenylalaninammoniumlyase (PAL, EC 4.3.1.5) des Senfkeimlings (Sinapis alba L.), ein elektrophoretisch einheitliches Enzym.
Planta (Berl) 99, 339-346 (1971)

Schopfer, P.: Phytochrome control of enzymes.
Annu.Rev.Plant Physiol. 28, 223-252 (1977)

Schröder, J., Betz, B., Hahlbrock, K.: Light-induced enzyme synthesis in cell suspension cultures of Petroselinum hortense. Demonstration in a heterologous cell-free system of rapid changes in the rate of phenylalanine ammonia-lyase synthesis.
Eur.J.Biochem. 67, 527-541 (1976)

Schröder, J., Kreuzaler, F., Schäfer, E., Hahlbrock, K.: Concomitant induction of phenylalanine ammonia-lyase and flavanone synthase mRNAs in irradiated plant cells.
J.Biol.Chem. 254, 57-65 (1979)

Schröder, J., Schäfer, E.: Radioiodinated antibodies, a tool in studies on the presence and role of inactive enzyme forms: regulation of chalcone synthase in parsley cell suspension cultures.
Arch.Biochem.Biophys. 203, 800-808 (1980)

Seitz, U., Richter, G.: Isolierung und Charakterisierung schnellmarkierter, hochmolekularer RNS aus frei suspendierten Calluszellen der Petersilie (Petroselinum sativum).
Planta 92, 309-326 (1970)

Seyffert, W.: Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei der Levkoje, Matthiola incana R.Br..
Z.Pflanzenzüchtg. 44, 4-29 (1960)

Seyffert, W.: Genetische Untersuchungen an Matthiola incana. I. Genlokalisation bei Koppelung mit einem Letalfaktor und Interaktion mit einem frei spaltenden Gen.
Biol.Zentralbl. 81, 253-266 (1962)

Seyffert, W.: Die Messung der spektralen Remission als objektive Methode zur Beschreibung und Klassifizierung von Phänotypen.
Der Züchter 33, 356-365 (1963)

Seyffert, W.: Simulation of quantitative characters by genes with biochemically definable action. II. The material.
Theor.Appl.Genet. 41, 285-291 (1971)

Seyffert, W.: Beiträge zur Genetik und Enzymologie der Flavonoide.
Biol.Zbl. 101, 465-483 (1982)

Seyffert, W.: Homeostasis in defined genotypes of Matthiola incana.
Theor.Appl.Genet. 64, 205-212 (1983)

Shah, D.M., Hightower, R.C., Meagher, R.B.: Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79, 1022-1026 (1982)

Shah, D.M., Hightower, R.C., Meagher, R.B.: Genes encoding actin in higher plants: Intron positions are highly conserved but the coding sequences are not.
J.Mol.Appl.Gen. 2, 111-126 (1983)

Spribille, R.: Nachweis und Charakterisierung der Chalkonsynthase unter Verwendung definierter Genotypen höherer Pflanzen.
Dissertation, Tübingen (1982)

Spribille, R., Forkmann, G.: Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of Matthiola incana R.Br..
Z.Naturforsch. 36c, 619-624 (1981)

Spribille, R., Forkmann, G.: Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of Anthirrhinum majus.
Phytochem. 21, 2231-2234 (1982)

Stafford, H.A.: Compartmentation in natural product biosynthesis by multienzyme complexes.
In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds.), vol. 7, 117-137.
Academic Press New York (1981)

Stein, G.S., Kleinsmith, L.J. (eds.): Chromosomal Proteins and their Role in the Regulation of Gene Expression. Academic Press, Inc. New York (1975)

Steinback, K.E.; Proteins of the chloroplast. In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds.), vol. 6, 303-319. Academic Press New York (1981)

Steiner, D.F., Quinn, P.S., Patzelt, C., Chan, S.J., Marsh, I., Tager, H.S.: Proteolytic cleavage in the posttranslational processing of proteins. In: Cell Biology - A comprehensive treatise, vol. 4: Gene expression: Translation and the behavior of proteins, Prescott, D.M., Goldstein, L. (eds.), 175-202. Academic Press New York (1980)

Sternberger, L.A.: The unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In: Immunocytochemistry (2nd ed.), 104-169. John Wiley & Sons New York (1979)

Sun, S.M., Slightom, J.L., Hall, T.C.: Intervening sequences in a plant gene - comparison of the partial sequence of cDNA and genomic DNA of French bean phaseolin. Nature 289, 37-41 (1981)

Sütfeld, R., Wiermann, R.: Chalcone synthesis with enzyme extracts from tulip anther tapetum using a biphasic enzyme assay. Arch.Biochem.Biophys. 201, 64-72 (1980)

Swaneck, G.E., Nordstrom, J.L., Kreuzaler, F., Tsai, M.-J., O'Malley, B.W.: Effect of estrogen on gene expression in chicken oviduct: Evidence for transcriptional control of ovalbumin gene. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 1049-1053 (1979)

Szulmajster, J.: Is sporulation a simple model for studying differentiation? Trends Biochem.Sci. 8, 18-22 (1979)

Tong, W.-F., Schopfer, P.: Absence of Pfr destruction in the modulation of phenylalanine ammonia-lyase synthesis of mustard cotyledons. Plant Physiol. 61, 59-61 (1978)

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)

Weeks, D.P.: Protein biosynthesis: Mechanisms and regulation.
In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds.), vol. 6, 491-529.
Academic Press New York (1981)

Weisbrod, S.: Active chromatin.
Nature 297, 289-295 (1982)

Wellmann, E., Schopfer, P.: Phytochrome-mediated de novo synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in cell suspension cultures of parsley.
Plant Physiol. 55, 822-827 (1975)

Wenzel, W.: Untersuchungen zur Genomorganisation, Genexpression und DNS-Evolution in dikotylen Angiospermen.
Dissertation, Tübingen (1980)

Wenzel, W., Hemleben, V.: A comparative study of genomes in angiosperms.
Pl.Syst.Evol. 139, 209-227 (1982a)

Wenzel, W., Hemleben, V.: DNA sequence organization and RNA complexity in Matthiola incana (Brassicaceae).
Pl.Syst.Evol. 140, 75-86 (1982b)

Wiermann, R.: Aktivität der Chalkon-Flavanon Isomerase und Akkumulation von phenylpropanoiden Verbindungen in Antheren.
Planta 102, 55-60 (1972)

Wiermann, R.: Secondary plant products and cell and tissue differentiation.
In: The Biochemistry of Plants, Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds.), vol. 7, 85-116.
Academic Press New York (1981)

Zimmermann, A., Hahlbrock, K.: Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. Purification and some properties of phenylalanine ammonia-lyase (E.C. 4.3.1.5).
Arch.Biochem.Biophys. 166, 54-62 (1975)

Zucker, M.: Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue.
Plant.Physiol. 40, 779-784 (1965)

Zühlke, H.: Insulin-biosynthesis and mode of action.
In: Cell Differentiation: Molecular Basis and Problems, Nover, L., Luckner, M., Parthier, B. (eds.), 324-348.
Springer-V., Berlin/Heidelberg (1982)

Lebenslauf

Name:	Rall, Susanne Sabine
Geboren:	07.06.1955 in Stuttgart
Eltern:	Rall, Gerhard, Zahnarzt, und Rall, Marlene, geb. Stäbler

Schulausbildung:

1962 - 1966	Volksschule Winnenden
1966 - 1974	Gymnasium Winnenden Abitur am 22.06.1974

Studium;

1974 - 1980	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1979 - 1980	Diplomarbeit am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Genetik, unter Anleitung von Prof. Dr. V. Hemleben Thema: Entwicklung von Rezipientensystemen zur Aufnahme von Plasmid-DNS in intakte Pflanzen und pflanzliche Zellen in Suspensionskultur.
1980	Diplomprüfung Biologie
1980 - 1983	Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Genetik, unter Anleitung von Prof. Dr. V. Hemleben
1978 - 1981	Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie
1981 - 1982	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Genetik
1982 - 1983	Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Genetik

Meine akademischen Lehrer waren:

Ammermann	Hadeler	Rieker
Bentrup	Hager	Sander
Bunke	Hemleben	Schwemmle
Engelmann	Jung	Seilacher
Engels	Lorenz	Seitz
Frey	Mecke	Seyffert
Gaude	Möhres	Strähle
Gradmann	Oberwinkler	Tichy
Grell	Pelling	Winkler
Guglielmi	Rähle	Wöhrmann

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353